

Aufbau nanoskopischer Hybridstrukturen
am Beispiel von MrgA und Purpurmembran

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Chemie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Andreas Schönafinger
aus München

Marburg/Lahn 2008

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation

am _____ angenommen.

Erstgutachter : Prof. Dr. N. Hampp (Philipps-Universität, Marburg)

Zweitgutachter: Prof. Dr. L.-O. Essen (Philipps-Universität, Marburg)

Tag der Disputation: _____

meinen Eltern

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

„Bioinspired Nanoencapsulation of Purple Membranes“

A. Schönafinger, S. Müller, F. Noll, and N. Hampp

Soft Matter **2008**, 4, 1249-1254.

„Morphology of Dry Solid-Supported Protein Monolayers Dependent on the Substrate and Protein Surface Properties“

A. Schönafinger, A. Morbitzer, D. Kreß, L.-O. Essen, F. Noll, and N. Hampp

Langmuir **2006**, 22(18), 7185-7191.

Abstract

Biological compounds display a rich variety of features which have implications for technical applications, such as catalysis and selective high affinity. The utility of biological compounds as building blocks for device fabrication, however, is severely hampered by two general restrictions: Firstly, biomolecules tend to lose their native biological integrity and function in other than near-physiological conditions, and they usually have poor long term stabilities. Secondly, many of the well established state-of-the-art techniques for building up nanostructured surfaces, such as methods used in silicon wafer based semiconductor fabrication, are not suited for the procession of biological building blocks. In order to tie in with these techniques new assembly strategies have to be implemented, such as bottom-up and templated self-assembly strategies. In this work, techniques to overcome these problems were elaborated in the context of two biological model substances: MrgA and purple membranes.

Firstly, the dodecameric iron storage protein MrgA was used to develop methods for generating nanostructured surfaces. By a three-step procedure (adsorption from an incubation solution, rinsing to remove excess salt and protein, and drying), dry monolayers of MrgA on various solid substrates were constructed, and their morphologies were analyzed by means of AFM. Hexagonal, two-dimensional crystalline monolayers on hydrophilic surfaces were obtained upon adsorption under aqueous conditions at low supersaturation. It was found that the formation of such two-dimensional crystals is heavily dependent on the pH and the salinity of the incubation solution as well as on the surface properties. The correlation of surface coverage with substrate charge, ionic strength, and pH indicated the dominance of electrostatic effects in adsorption – due to the competing interactions of intermolecular repulsion and protein-substrate attraction. In this work, it is shown that adsorption of MrgA leading to the formation of two-dimensional crystals is favoured under conditions close to the isoelectric point of the biomolecule.

These results were used to further develop techniques for the guided self-assembly of MrgA nanostructures. To this end, substrates which are nanostructured in regard of their affinities to the protein were generated on template-stripped gold by micro-contact printing of functionalized thiols. Taking advantage of the fine-tunable affinity and a phenomenon usually regarded as an undesired artifact in micro-contact printing, the

edge-dominant ink transfer, the surface-templated self-assembly of MrgA in nanometer patterns was achieved. In addition, the protein-shell was removed by pyrolysis in a low pressure oxygen plasma. After this procedure, the metaloxide cores of the *holo*-protein were found to remain at the location where the proteins had originally been adsorbed on the surface. Therefore, the system developed in this work fulfils all requirements for being a useful tool for structured nanoparticle deposition.

Both the discovered novel adsorption morphologies on non-structured substrates and the guided self-assembly of protein nanostructures, represent promising starting points for further scientific studies, such as solid-supported co-crystallization with DNA, and developments aiming at technological applications like the mesostructured deposition of MrgA-caged nanoparticles.

Secondly, a method for improving the stability of biological compounds far beyond the limits of natural conditions was developed based on purple membrane as a model substance. Generally, embedding such targets in solid host material increases the stability and the range of possible applications. In medicine and biotechnology, there is a great interest in such composite hybrid materials in form of micro- or nanosized particles.

In this work, a biomimetic approach for the encapsulation of biomolecules with silica is presented. It was inspired by the remarkable biomineralisation performed by some eucaryotic algae, the so-called diatoms. In the method elaborated here, two generic techniques were combined: In a first step, the surface of the biomolecule was modified *via* polyelectrolyte layer adsorption. It was shown that the polyamines used in the first step allow for the surface-templated mineralization of silicic acid and silica nanoparticles on the modified surface in the second step of preparation. Both preparative steps were optimized towards mild conditions as required by many biomolecules. Application of this method to the model substance purple membrane resulted in a defined hybrid material with a nano-scale protective encapsulating silica shell. It was demonstrated that while the purple membrane retains its biological function, it is also shielded from otherwise detrimental solvents or molecules of low molecular weight. The method presented here not only allows for the production of significant amounts of encapsulated material, but it was furthermore shown to be adaptable to a variety of substances, such as single-walled carbon nanotubes and polymer microparticles – emphasizing the wide range of application for this method.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	- 13 -
1. Einleitung: Biologische Komponenten in technischen Anwendungen	- 14 -
1.1 Aufgabenstellung	- 15 -
1.2 MrgA	- 16 -
1.2.1 Eigenschaften von MrgA	- 16 -
1.2.2 Proteinadsorption auf festen Substraten	- 18 -
1.2.3 MrgA als Träger monodisperser Nanopartikel	- 19 -
1.3 Purpurmembran	- 22 -
1.3.1 Eigenschaften von PM	- 22 -
1.3.2 Verkapselung biologischer Bausteine	- 25 -
1.3.3 Strategie zur biomimetischen Nanoverkapselung von PM	- 26 -
2. Material und Methoden	- 29 -
2.1 Chemikalien	- 29 -
2.2 Biomoleküle	- 30 -
2.2.1 MrgA	- 30 -
2.2.2 Isolation von Purpurmembranen	- 31 -
2.3 Herstellung ultraglatte Substrate für die Proteinadsorption	- 31 -
2.3.1 Herstellung ultraglatte, unstrukturierter Substrate	- 32 -
2.3.2 Mikrokontaktdruck zur Nanostrukturierung von TSG	- 34 -
2.3.3 MrgA-Adsorption auf ultraglatte Substraten	- 35 -
2.4 MrgA als Träger von Nanopartikel: Entfernung der Proteinhülle	- 36 -
2.5 Biomimetische Nanoverkapselung	- 36 -
2.5.1 Standardprotokoll für die Verkapselung von PM	- 36 -
2.5.2 Bestimmung der an PM adsorbierten Menge an PEI	- 36 -
2.5.3 Stabilitäts- und Photochromietest von PM	- 37 -
2.5.4 Anwendung der Verkapselungsmethode auf anderer Oberflächen	- 37 -

2.6 Hochauflösende Analysemethoden	- 40 -
2.6.1 Elektronenmikroskopie	- 40 -
2.6.2 Abbildungen mittels Atomkraftmikroskopie	- 40 -
3. Ergebnisse und Diskussion	- 42 -
3.1 Adsorptionsexperimente mit MrgA	- 42 -
3.1.1 Morphologie von MrgA-Monolagen auf Glimmer	- 44 -
3.1.2 Morphologie von MrgA-Monolagen auf modifiziertem TSG	- 47 -
3.1.3 Tendenzen der MrgA-Adsorption	- 50 -
3.1.4 MrgA-Monolagen auf Siliziumwafer: Umpolung der Oberflächenladung	- 52 -
3.1.5 Optimierung der MrgA-Monolagen auf modifiziertem TSG	- 53 -
3.1.6 Vergleich der Adsorption auf unterschiedlichen Substraten	- 54 -
3.1.7 Kristallisationsinduktion in adsorbierten MrgA-Monolagen durch Mg^{2+} -Ionen	- 55 -
3.1.8 Mikro- und nanostrukturierte MrgA-Monolagen	- 56 -
3.1.9 MrgA als Träger für Nanopartikel	- 61 -
3.1.10 Übertragbarkeit der Adsorptionsexperimente auf andere Proteine	- 63 -
3.2 Biomimetische Nanoverkapselung von PM und anderen Modell-	
substanzen	- 64 -
3.2.1 Biomimetische Nanoverkapselung von PM: Entwicklung einer Methode	- 64 -
3.2.2 Verwendung der verkapselten PM als photochromes Farbpigment	- 74 -
3.2.3 Biomimetische Nanoverkapselung anderer Modell-Oberflächen	- 74 -
4. Zusammenfassung und Ausblick	- 78 -
4.1 Oberflächenstrukturierung durch Proteinadsorption	- 78 -
4.2 Nanoverkapselung biologischer Bausteine	- 79 -
4.3 Allgemeiner Ausblick	- 80 -
5. Literaturverzeichnis	- 83 -
6. Danksagungen	- 90 -

Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
HCP	hexagonal dichte Packung
AFM	Atomkraftmikroskopie oder Atomkraftmikroskop
BR	Bakteriorhodopsin
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
Dps-Protein	<i>DNA-protecting proteins from starved cells</i>
EDX	<i>energy-dispersive X-ray spectroscopy</i>
LB	Langmuir-Blodgett
LTM-AFM	<i>liquid tapping mode atomic force microscopy</i>
MOSFET	<i>metal oxide field-effect</i> Transistor
NP	Nanopartikel
PEI	Poly(ethylenimin)
pI	Isoelektrischer Punkt
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RSA	<i>random sequential adsorption</i>
RT	Raumtemperatur
SAM	selbstassemblierte Monolage
SWNT	<i>single wall carbon nanotubes</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEOS	Tetraethoxysilan
TSG	<i>template-stripped gold</i>
μCP	Mikrokontaktdruck

1. Einleitung: Biologische Komponenten in technischen Anwendungen

Wirkungsprinzipien in der belebten Natur waren und sind eine Quelle der Inspiration für viele innovative Entwicklungen. Auf fast allen Größenskalen finden sich Beispiele, die in ihrer Effizienz künstliche Systeme in vielerlei Hinsicht weit übertreffen.

Die Nachahmung der Prinzipien der Natur für technische Anwendungen wird häufig mit den nur vage definierten Begriffen der Bionik oder Biomimetik bezeichnet. Im Bereich moderner Oberflächenstrukturierungen finden beispielsweise Nachahmungen des Lotusblättereffekts zur Selbstreinigung von Oberflächen oder die in Wasser bzw. Luft besonders reibungsarmen Adaptionen der Haihautstrukturierung Einzug in kommerzielle Produkte.

Auf zellulärer Ebene beeindrucken nicht nur die Selektivität und Spezifität biochemischer Prozesse sondern auch ihre räumliche Organisation und Regulierung. Es ist heute selbstverständlich, dass in der modernen Medizin Kenntnisse der molekularen Wirkungsmechanismen biochemischer Vorgänge direkte Implikationen für neue Wirkstoffe haben.

Aber auch in anderen Bereichen werden molekulare Struktur motive aus der Biologie eingesetzt. Dabei sind vor allem zwei Klassen von Struktur motiven technisch bedeutsam: Solche, die eine hochselektive Affinität aufweisen, und Enzyme aus extremophilen Organismen, die durch ihre evolutionäre Anpassung an extreme Lebensbedingungen besonders widerstandsfähig sind. Temperaturbeständige DNA-Polymerasen werden beispielsweise in der PCR eingesetzt, aber auch bei in viel größerem Umfang produzierten Produkten, wie Waschmitteln, werden solch robuste Enzyme eingesetzt. Die Immobilisierung affiner Struktur motive wie einzelsträngige DNA, Sequenzen aus Antikörpern und modifizierte Inhibitoren bilden die Grundlage vieler Trennverfahren, Biosensoren, Markierungs- und Screeningmethoden.

Die Ausnutzung affiner Motive aus der Natur und der Selbstassemblierung für bottom-up-Strategien des Aufbaus meso- und nanoskopischer Bausteine ist Gegenstand aktueller Forschung.(1,2)

1.1 Aufgabenstellung

Dem Einsatz biologischer meso- oder nanoskaliger Bausteine außerhalb ihres natürlichen Kontextes sind gewisse Grenzen gesetzt. Das prominenteste Problem rührt daher, dass die molekularen Gebilde in lebenden Organismen evolutionär für spezifische Umgebungen optimiert sind und abseits physiologischer Bedingungen in der Regel ihre Struktur und damit ihre biologische Funktion verlieren. Ein ganz anderes, weitgehend ungelöstes Problem, ist, dass die für die Halbleitertechnik entwickelten Verfahren gänzlich ungeeignet zur Strukturierung von Oberflächen durch große Biomoleküle sind, da hierbei in der Regel Arbeitsschritte unter extrem harschen Bedingungen durchgeführt werden. Um an etablierte hochentwickelte Verfahren anknüpfen zu können, ist es notwendig, für biologische Komponenten alternative Methoden und Techniken zu entwickeln, die sich als ergänzende Fabrikationsschritte in konventionelle Verfahren integrieren lassen. Auf Grund der enormen Diversität der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Biomolekülen ist der Anspruch auf Universalität solcher neuer Methoden allerdings ein hoch gestecktes Ziel.

In der vorliegenden Arbeit werden konkrete Lösungsansätze für diesen Problemkomplex anhand des dodekameren MrgA aus *Bacillus subtilis* 168 (3) und von Purpurmembranen (PM) aus *Halobacterium salinarum* (4) vorgestellt. Konzeptionell sind hierbei eine breite Anwendbarkeit und die Übertragbarkeit auf für die Industrie relevante Substanzmengen bei der Entwicklung der Methoden erstrebenswert.

Unter Ausnutzung der speziellen Eigenschaften der eingesetzten Biomoleküle, nämlich der Photochromie des PM und den Eisenspeichereigenschaften des MrgA, sollen die Möglichkeiten, die die Integration von Biomolekülen in technische Produkte bietet, aufgezeigt werden.

Durch die Verwendung zweier Biomoleküle mit ganz unterschiedlichen Eigenschaften ergibt sich dabei eine logische Gliederung der Arbeit in zwei Teile, dem MrgA- und dem PM-Teil. Die in diesen Teilen vorgestellten Herangehensweisen zum Aufbau von Nanohybridstrukturen sind unterschiedlicher Natur: Während die Oberfläche von PM durch Adsorption geeigneter Polymere zur templierten biomimetischen Silikatmineralisation befähigt werden soll, kommt MrgA als Adsorbat auf strukturierten Oberflächen zum Einsatz.

1.2 MrgA

In diesem Unterkapitel werden die für das Verständnis der mit MrgA durchgeführten Experimente notwendige Grundlagen diskutiert.

1.2.1 Eigenschaften von MrgA

MrgA aus *Bacillus subtilis* 168 (3) (PDB-ID: 2CHP) ist ein dodekameses, ferritinähnliches, Eisenspeicher-Protein, das der Gruppe der Dps-Proteine (*DNA-protecting proteins from starved cells*) zugeordnet wird.(5) Dps-Proteine weisen signifikante strukturelle Homologien zu den aus 24 identischen Untereinheiten aufgebauten und hochgradig konserviert in fast allen Organismen vorkommenden Ferritinen auf. Beide Proteinfamilien, die Ferritine und Dps, haben einen gemeinsamen evolutionären Ursprung, und es ist wahrscheinlich, dass sich Dps aus den gemeinsamen Vorfahren, den Häm- oder metallbindenden Proteinen, entwickelt und erst später im Gegensatz zum Ferritin seine DNA-bindenden Eigenschaften erworben hat.(6)

Aus den 3D-Kristallstrukturen ist bekannt, dass der dodekamere MrgA-Komplex die Quartärstruktur einer Hohlkugel mit acider innerer Oberfläche und auf der Außenseite lokalisierten basischen Lysinresten (am N-Terminus) hat. (7) MrgA kristallisiert in der Raumgruppe $P2_13$, deren Gitter durch Stapelung 2D-hexagonaler Proteinlagen aufgebaut ist. Bei neutralem pH weist der Komplex eine negative Nettoladung von -168 e auf. Abbildung I 1 zeigt das berechnete Oberflächenpotential von MrgA bei pH 7 und einer monovalenten Salzkonzentration von 100 mM. Diese Rechnungen wurden mit dem Programm GRASP durchgeführt.(8)

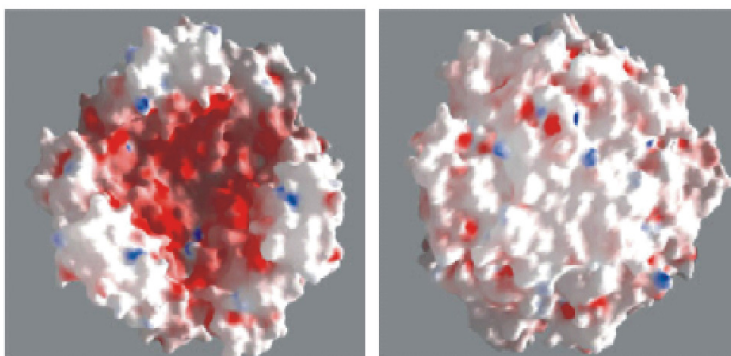


Abbildung I 1. Berechnetes Oberflächenpotential des dodekameren MrgA. Der linke Querschnitt zeigt die inner Oberfläche des hohlkugelförmigen Proteins während in der rechten Abbildung die äußere Oberfläche dargestellt ist. Negative geladene Bereiche (-75.3 kJ/e) werden rot und positive (+75.3 kJ/e) blau dargestellt.

Dps-Proteine spielen eine wichtige biologische Rolle beim Schutz vor verschiedenen Stressfaktoren, wie oxidativer Stress, UV- und Gamma-Strahlung, Eisen- und Kupfertoxizität, thermischer Stress und saurem oder basischem Schock.(9) Diese biologische Schutzfunktion basiert im Wesentlichen auf drei Eigenschaften der Dps-Proteine, die noch unter Nährstoff- und vor allem ATP-Mangel wirksam sind:

I. Dps weisen im Gegensatz zu den Ferritinen eine hohe aber sequenzunspezifische DNA-Affinität auf.(10,11) Unter bestimmten Voraussetzungen führt dies zur Ausbildung kristalliner DNA-Dps-Aggregate. Eingebettet im Kristall ist die doppelsträngige DNA-Helix wesentlich unempfindlicher gegenüber vielen physikalischen oder chemischen Stressfaktoren.

II. Durch die Ferroxidaseaktivität werden giftige Peroxide abgebaut. Anders als bei den 24-meren Ferritinen, die molekularen Sauerstoff als Oxidationsmittel nutzen (12), wird das Eisen bei den Dps-Proteinen auch unter Verbrauch von H_2O_2 oxidiert (13).

III. Durch die Biomineralisierung und Speicherung von Metallionen und im Besonderen von Eisen(II)-Ionen, die an der Fenton-Reaktion beteiligt sind,(14) im inneren Hohlraum des Proteins wird die Entstehung hyperreaktiver Radikale, die Schädigungen der DNA oder Proteinen hervorrufen können, reduziert.

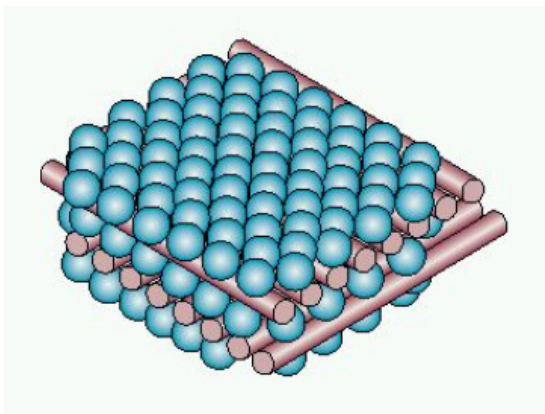


Abbildung I 2. (15) Hypothetisches Modell der geschichteten Anordnung der Dps-Dodecamere (blau) und DNA-Doppelstränge (rot) in einem Dps-DNA-Cokristall.

Die Bildung kristalliner Dps-DNA-Aggregate wurde sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beobachtet.(15,16) Abb. I 2 zeigt das hypothetische Modell der geschichteten Anordnung der Dps-Dodecamere (blau) und DNA-Doppelstränge (rot) in einem Dps-DNA-Cokristall. Die Dps-Dodecamere bilden quasi eine geordnete Matrix für die Einlagerung der DNA-Stränge.

Die genaue Natur der Wechselwirkung zwischen DNA und Dps und ihre Regulation ist noch nicht völlig aufgeklärt. Es wurde vorgeschlagen, dass in lebenden Zellen die Dps-DNA-Wechselwirkung durch die Salzkonzentration reguliert wird.(15,16) Frenkiel-Krispin *et al.* (16) schlugen vor, dass Dps-Dodekamere DNA-Moleküle nicht direkt binden können, sondern verbrückende Mg^{2+} -Ionen die Dps-DNA-Aggregation vermitteln. Andere Studien zeigen jedoch, dass die direkte Wechselwirkung des hoch flexiblen, lysinreichen N-Terminus eine wesentliche Rolle in der DNA-Dps-Wechselwirkung spielt. (7) Die Tatsache, dass bei Mitgliedern der Dps-Familie, denen ein positiv geladener N-Terminus fehlt, im Agarosegel-Mobilitätstest (*agarose gel mobility assays*) keine DNA-Bindung nachgewiesen werden konnte, unterstützt diesen Befund.(17-20)

Auch die Selbstaggregation der Dps ist stark abhängig von den Eigenschaften des N-Terminus. *Escherichia coli* Dps benötigt bei neutralen pH-Werten mindestens 150 mM NaCl, um in Lösung zu bleiben, während Dps-Proteine ohne positiv geladenen N-Terminus häufig selbst in Abwesenheit von Salzen löslich sind.(20)

1.2.2 Proteinadsorption auf festen Substraten

Die Wechselwirkungen von Proteinen mit festen Oberflächen ist ein grundsätzliches Phänomen mit weitreichenden Implikationen für die Nanotechnologie, Biotechnologie und die Biomaterialwissenschaften. Von besonderer praktischer Bedeutung sind geordnete, zweidimensionale (2D) Anordnungen von Proteinen. Diese werden unter anderem für so unterschiedliche Bereiche wie der Elektronen-Kristallographie (21) oder der Entwicklung nanotechnologischer Bauelemente (1,22) benötigt.

2D-Proteinkristalle, die den Qualitätsanforderungen hochauflösender Strukturanalysen genügen, werden üblicher Weise an einer Flüssig-Lipid-Grenzfläche erhalten.(21) Dabei kann die Kristallisation durch Anwendung externer, lateral zusammendrückender Kräfte (LB-Technik) kontrolliert werden. In manchen Fällen genügt es auch, eine Proteinlösung an der Grenzfläche zwischen Flüssigkeit und Luft zu spreiten.(23) Diese 2D-kristallinen Filme lassen sich auf ein festes Substrat übertragen. Jedoch ist der Transfer zeitaufwendig und kaum für größere oder strukturierte Oberflächen geeignet. Auf der anderen Seite führt die direkte Adsorption von Proteinen auf feste Substrate üblicherweise nicht zu großflächig kristallinen Proteinlagen. Perfekt glatte Substrate, ausreichende laterale Mobilität individueller Proteine, die die Nukleation und Kristallwachstum zulassen, und die natürliche Neigung der Proteine zur

zweidimensionalen Selbstassemblierung (z.B. S-layer-Proteine (1)) werden als essentielle Voraussetzungen für das 2D-Kristallwachstum auf festen Substraten angesehen.

Für die effiziente und reproduzierbare Präparation trockener Proteinlagen auf festen Substraten sind Kenntnisse und Kontrolle sowohl der während der Adsorption als auch der beim Trocknen ablaufenden Prozesse notwendig. Die Menge an adsorbiertem Protein wird durch die Balance und Art der Wechselwirkungen zwischen den Proteinen untereinander und zwischen dem Protein und dem Substrat beeinflusst. Modellvorstellungen der Proteinadsorption reichen von sehr einfach gehaltenen Equilibrium-Modellen, die Clusterbildung berücksichtigen, (24) bis hin zu komplizierten dynamischen Simulationen, die sowohl den Equilibrium- und den kinetisch frustrierten Nonequilibrium-Zustand als auch die Morphologie des Adsorbats beschreiben (25). Allerdings berücksichtigt keines der gegenwärtig diskutierten Modelle alle Aspekte der Protein-Adsorption.(26)

Während des Trocknens der Adsorbatschicht auftretende Kapillarkräfte können eine laterale Neuordnung der Proteine auf dem Substrat hervorrufen.(27) Denkov (29) stellte hierzu ein qualitatives Modell des Kristallisations-Mechanismus in trocknenden Kolloidalfilmen vor. Triebkraft der Kristallisation sind:

I. die kapillare Anziehung, die selbst für nanoskalige Partikel viel größer als die thermische Energie ($k_B T$) sein kann,(30) und

II. der konvektive Partikelstrom, der durch Verdampfen an den vorgeordneten Bereichen hervorgerufen wird.

1.2.3 MrgA als Träger monodisperser Nanopartikel

Je kleiner die Dimensionen eines Objektes werden, desto stärker treten Quanten- und Grenzflächenphänomene gegenüber den Eigenschaften im Inneren des betrachteten Objektes in den Vordergrund. So besitzen Nanopartikel (NP) unter Anderem einzigartige photonische, elektronische, magnetische und katalytische Eigenschaften, die sich grundlegend von denen des Bulkmaterials unterscheiden und eine Funktion ihrer Größe sind.(31-33) Die Integration der einzigartigen Eigenschaften von NP in technische Lösungen, wie z.B. in der Entwicklung hocheffizienter und vor allem günstiger Solarzellen auf der Basis von halbleitenden NP,(34) ist ein breites Forschungs- und Entwicklungsfeld.

In diesem Kontext sind die Vertreter der ferritinähnlichen Eisenspeicherproteine interessant, da sie in der Lage sind, verschiedene homogene Metalloxid-NP in ihrer inneren Kavität zu mineralisieren (35-39). Dabei erwerben die durch die Proteinhülle eingeschlossen NP die Löslichkeit und die affinen Eigenschaften des Proteins. Die räumliche Begrenzung auf die innere Kavität des Eisenspeicherproteins gibt hierbei die Größe der NP vor und bedingt eine monodisperse Größenverteilung. Durch die Vertreter der Ferritin-Superfamilie stehen damit auf anderem Wege schwer zugängliche NP mit einem Durchmesser von 7 nm bis etwa 3 nm zur Verfügung. (vgl. Tab. I 1)

Ferritin (Organismus)	äußerer Durchmesser (nm)	eingeschlossenes Volumen (nm ³)	Eisenkapazität (Atome)
Ferritin (aus Pferdemicz)	12.5	268	4500
Bacterioferritin Bfr (<i>E. coli</i>)	11.9-12.8	113	1800
Dps (<i>E. coli</i>)	9	48	500
MrgA (<i>B. subtilis</i>)	9.2	<i>n. d.</i>	<i>n. d.</i>
NapA (<i>H. pylori</i>)	9.6	<i>n. d.</i>	500

Tab. I 1. (40) Dimensionen der Hohlkugel, wie sie die Mitglieder der Ferritin-Superfamilie bilden. (n. d.: *not determined*).

Da die meisten Ferritine zudem außergewöhnlich stabile Proteine und NP in der inneren Kavität gut gegenüber Aggregation geschützt sind, scheinen Vertreter dieser Protein-Superfamilie sich als Hilfsmittel für die Handhabung und Fabrikation von NP zu eignen.

Durch Anpassung der Wechselwirkung des Proteins zu seinem Substrat, z.B. durch genetische an der Proteinoberfläche eingeführte spezifisch affine Peptide (41) oder durch Einstellung der Oberflächenpotentiale durch Substratmodifikation und Zusammensetzung der Inkubationslösung (Gegenstand dieser Arbeit), lassen sich 2D-hexagonal dicht gepackte (2D-HCP) Monolagen der proteinverkapselten NP darstellen. Die Gitterabstände sind dabei nicht durch die Größe des NP sondern durch die des Eisenspeicherproteins gegeben.

Solche dicht gepackten NP-Monolagen auf der Basis von Ferritin können z.B. bei der Fabrikation von mit *floating-gate nanodots* versehenen MOSFETs, die als *floating-gate memory* fungieren, eingesetzt werden.(22) Aber auch für andere potentielle auf NP-Lagen basierende Anwendungen sind geordnete Morphologien wünschenswert, da die

Quanten-eigenschaften von NP durch ihre Nachbarn beeinflusst werden. Dies gilt auch für Anwendungen von Biomoleküllagen, da ihre biologischen Funktionen nicht unbedingt in jeder Orientierung auf der Oberfläche erhalten bleibt (42) und eine kristalline Umgebung in der Regel stabilisierend wirkt. Die Kombination mit anderen Techniken, die zu mikrostrukturierten Proteinmonolagen führen, wie dem Mikrokontaktdruck (μ CP) (43,44), ist allerdings schwierig und man erhält in der Regeln amorphe Lagen (45).

1.3 Purpurmembran

Im folgenden Unterkapitel werden grundlegende Aspekte der im späteren Teil dieser Arbeit anhand der Modells substanz PM angewendeten Strategien erörtert.

1.3.1 Eigenschaften von PM

Bakteriorhodopsin (BR), ein integrales Membranprotein aus dem extrem halophilen Archaeobakterium *Halobacterium salinarum*, (4) wurde seit seiner Entdeckung 1971 intensiv untersucht und gehört heute mit mehr als 7.000 wissenschaftlichen Publikationen und über 200 Patenten, die BR als Stichwort enthalten, zu den am besten charakterisierten Membranproteinen überhaupt.

Die natürliche Erscheinungsform von BR ist die einer kristallinen, 2D-hexagonal dichten Anordnung von BR-Trimeren in der Zellmembran, der sogenannten Purpurmembran (PM), (46,47) die bis zu 80 % der Zelloberfläche des *Halobacterium salinarum* ausmachen kann. Diese Membran lässt sich bezüglich seiner physikalischen Eigenschaften kaum mit denen von fluiden Bilipidmembranen vergleichen: Sie ist ein sehr starres Gebilde von definierter Stöchiometrie, in dem selbst die Positionen spezifischer Lipide räumlich festgelegt sind. Die Einbettung des BR in die bis zu 5 µm großen und leicht isolierbaren (48) PM führt zu einer bemerkenswerten pH- und Temperaturstabilität.(49)

In dieser kristallinen Konfiguration liegt der Umstand begründet, dass Bakteriorhodopsin das erste integrale Membranprotein war, dessen Struktur aufgeklärt(50) und dessen Topographie hochauflösend mittels AFM abgebildet (51) werden konnte. Aus den Strukturdaten ist bekannt, dass das aus 248 Aminosäuren aufgebaute BR die Tertiärstruktur von 7 transmembranständigen α -Helices annimmt, in dessen inneren, hydrophilen Kanal das Chromophor Retinal über eine Imidbindung an das Lys216 gebunden ist.

Das nachhaltige Interesse am Membranprotein BR liegt nicht zuletzt darin begründet, dass es einen in der Natur einzigartigen Mechanismus des lichtabsorptionsinduzierten, extrazellulär gerichteten Protonentransports aufweist, der im Organismus analog zur Photosynthese in Pflanzen der photosynthetischen Energiegewinnung dient.(52) Der damit assoziierte Photozyklus des BR ist in vielen Details gut verstanden:(53-58)

Der Protonentransport im BR wird durch Photoisomerisierung des Retinals von der *all-trans*- zur *13-cis*-Konfiguration eingeleitet. (vgl. Abb. I 3)

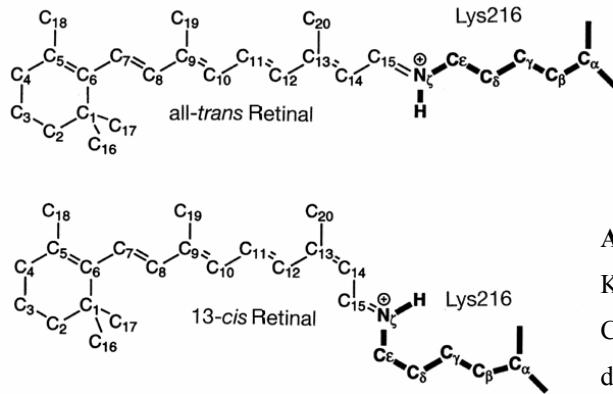


Abbildung I 3. Die *all-trans* und die *13-cis* Konfiguration des Retinals in BR. Das Chromophor ist über eine Schiffsche Base an das Lys216 kovalent gebunden.

Dies löst einen über spektroskopisch unterschiedene Zwischenzustände (Indizierung nach Absorptionsmaximum) ablaufenden, geschlossenen Photozyklus aus, dessen Nettoeffekt der Transport eines Protons von der zytoplasmatischen auf die extrazelluläre Seite der Membran ist. In Abbildung I 4 werden ein vereinfachter Photozyklus (verändert nach Edman (59)) und die Halbwertszeiten der Intermediate bei Raumtemperatur (RT) dargestellt.

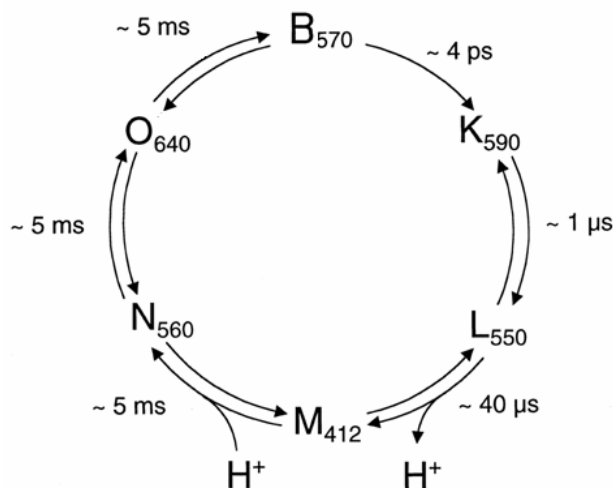


Abbildung I 4. Schematische Darstellung des Photozyklus von BR. Die Absorptionsmaxima des Grundzustandes (B₅₇₀) und der wichtigen Intermediate wird in nm als Index angegeben. Die spezifische Lebensdauer bei RT und die Deprotonierung (L₅₅₀→M₄₁₂) bzw. Protonierung (M₄₁₂→N₅₆₀) des Retinals werden neben den Pfeilen dargestellt.

Es gibt wesentlich genauere Darstellungen des Photozyklus von BR, die zusätzliche Intermediate und Übergänge auflisten, die teilweise nur in bestimmten Mutanten von BR auftreten oder nur unter extremen Bedingungen (Zweiphotonenreaktion) erreichbar sind.

Diese Zustände können eine wichtige Rolle für auf PM-basierenden Anwendung, z.B. der P_{490} -Zustand zur Datenspeicherung, spielen.(57)

Die Intermediate des Photozyklus, die *a priori* lediglich spektroskopisch unterschiedene Zustände sind, konnten konkreten Protonierungs- und Isomerisierungszuständen des Retinals und der am Protonentransport beteiligten Aminosäuren zugeordnet werden. In Abbildung I 5 werden konkrete Übergänge Protonentransportschritten zugeordnet.(56)

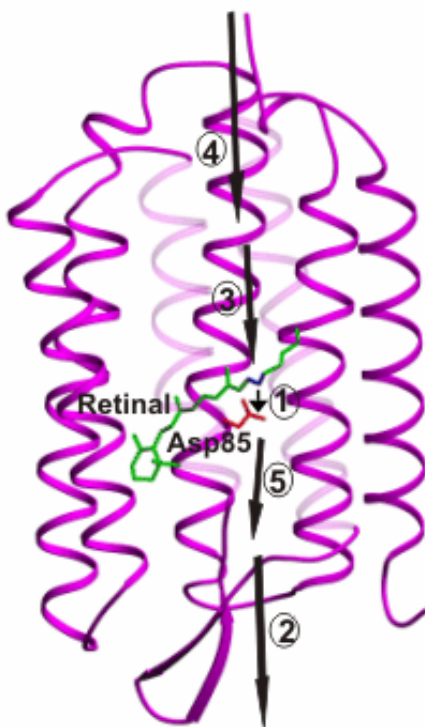


Abbildung I 5. (56) Primäre Protonentransportschritte im BR:

- (1) Primärer Protonentransfer von der Schiff'schen Base zum Asp85 ($L_{550} \rightarrow M_{412}$) unter gleichzeitiger
- (2) Protonenabgabe auf der extrazellulären Seite durch den Protonenfreisetzungskomplex,
- (3) Reprotonierung der Schiff'schen Base vom Asp96 ($M_{412} \rightarrow N_{560}$) gefolgt von der thermischen Rückisomerisierung des Retinals in die all-*trans* Konfiguration,
- (4) Reprotonierung des Asp96 von der zytoplasmatischen Seite ($N_{560} \rightarrow O_{640}$),
- (5) Protonierung des extrazellulären Freisetzungskomplexes vom Asp85 ($O_{640} \rightarrow B_{570}$).

Durch Variation des pH-Wertes oder durch gezielte Punktmutationen der am Photozyklus beteiligten Aminosäuren kann die Lebensdauer bestimmter Intermediate gezielt verändert werden. Bei der BR-Variante BR-D96N, in der an der Position 96 das deutlich basischere Asn eingeführt wurde, verläuft die Reprotonierung des 13*cis*-Retinals langsamer als in Wildtyp ab. Dies führt zu einer Lebensdauererlängerung des M (genauer des M^{II}) Intermediates.(60)

Materialien wie D96N, die ausreichend langlebige, durch Lichtabsorption überführbare Zustände mit unterschiedlicher Absorptionsbande aufweisen, werden photochrome Materialien genannt.

1.3.2 Verkapselung biologischer Bausteine

Die Einbettung biologischer Komponenten in die Umgebung eines festen *host*-Materials ist ein viel versprechender Ansatz, um die native biologische Funktion oder Aktivität zu modulieren und unter anderenfalls widrigen Bedingungen zu erhalten. Die Konservierung oder sogar Verstärkung der Aktivität von Enzymen wurde bei ihrer Einkapselung in verschiedene Matrix-Materialien, wie Silikat-Sol-Gel-Matrices (61-63), Organo-Schichtsilikate (63) und Polymere (65,66), beobachtet. Wenn diese Hybridmaterialien als mikro- oder nanoskopische Partikel vorliegen, so werden diese Materialien häufig als mikro- bzw. nanoverkapselte Enzyme bezeichnet.

Obwohl die Mikroverkapselung bereits in der Medizin (67-70) und Biotechnologie (71) erfolgreich eingesetzt wird und dadurch biologische Bausteine in einem Größenbereich von kleinen, therapeutisch wirksamen Peptiden über Enzyme bis hin zu ganzen Zellen abseits ihrer nativen Umgebung eingesetzt werden konnten, bleibt die gezielte Herstellung solcher Hybridmaterialien mit ganz spezifischen Eigenschaften ein schwieriges Unterfangen. Die Einkapselung von Biomolekülen ist ein Multiparameterproblem bezüglich des breiten Spektrums an physikalischen und biochemischen Eigenschaften von Biomolekülen (Stabilität, Löslichkeit, Kofaktoren, etc.), die bei Verkapselungsverfahren berücksichtigt werden müssen und durch die Wechselwirkungen in der Mikroumgebung des Kapselmaterial beeinflusst werden, und den gewünschten Eigenschaften des Kapselmaterials (Porosität, Biokompatibilität, Freisetzung des eingekapselten Materials etc.), die sich wechselseitig beeinflussen und beide die Eigenschaften des neuen Hybridmaterials definieren. Es besteht großes Interesse an möglichst breit anwendbaren Methoden zur Herstellung von Mikro- oder Nanopartikeln solcher Hybridmaterialien mit hohem Durchsatz.

In den letzten Dekaden wurden verschiedene auf Phasenseparation oder Kopräzipitation basierende und auf eine Vielzahl von Biomolekülen anwendbare Methoden wie das Sprühgefriertrocken (72) oder emulsionsbasierende Techniken (73) entwickelt, um diese Hybridmaterialien als amorphe Mikropartikel zu erhalten.

Bei neueren Ansätzen wird versucht, den Aufbau der Verkapselung auf der Nanoskala zu kontrollieren. Eine breit anwendbare Technik zur Herstellung ultradünner Filme mit einer im Nanometerbereich definierten Dicke, Zusammensetzung und Eigenschaften ist die sequentielle Adsorption (*layer-by-layer*-Technik) von

entgegengesetzt geladenen Makromolekülen aus der Lösung auf ein festes Substrat.(74) Diese Technik wurde für die Verkapselung kolloidaler Proteinaggregate (75) sowie einzelner Biomoleküle (76) (humanes Serum-Albumin und DNA) eingesetzt.

1.3.3 Strategie zur biomimetischen Nanoverkapselung von PM

Bei den meisten Verkapselungstechniken soll das eingeschlossene Material als Antwort auf einen externen Auslöser oder nach einer definierten Zeitspanne kontrolliert freigesetzt werden,(75) in anderen Fällen ist es jedoch wünschenswert, dass niedermolekulare Verbindungen in das eingekapselte Volumen hinein oder heraus diffundieren können.

Im Falle der Verkapselung von PM war eine nanoskalige Verkapselung, die gleichzeitig eine hohe Diffusionsbarriere für kleine Moleküle darstellt, die Zielsetzung. Dadurch sollte sich PM auch in einer chemisch „feindlichen“ Umgebung als photochromes Pigment einsetzen lassen. Ein Austausch von Molekülen ist nicht notwendig oder sogar unerwünscht. Da sich ein zusätzlicher, durch die Kapsel eingebrachter Beitrag zur Lichtstreuung negativ auf optische Anwendungen von PM auswirkt, ist es erstrebenswert, diese möglichst dünnwandig zu gestalten.

Die hierbei verfolgte Strategie ist durch Kieselalgen inspiriert: Diese sog. Diatomeen sind der dominante Bestandteil der pflanzlichen Biomasse im Meer und Süßwasser und bekannt für ihre spezifische Zellwandarchitektur aus amorphem Silikat.(77,78) Silaffine, posttranslational mit langkettigen Oligo-N-methyl-propyleneamin modifizierte Proteine, wurden als organischer Hauptbestandteil des Diatomeenbiosilikates identifiziert,(79) und es konnte *in vitro* gezeigt werden, dass Oligo-N-methyl-propylenamine und analoge Polyamine die Polykondensation von Kieselsäure unter milden Bedingungen katalysieren (80-82), was für die gerichtete Silikatmineralisation genutzt werden kann.(83)

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verkapselungsstrategie kombiniert zwei allgemeine, strukturaufbauende Konzepte und führt zu einer nur wenige Nanometer dicken Silikat kapsel mit niedriger Porosität: Adsorption einer Polyelektrolytlage aus Polyaminen und der gerichteten biomimetischen Silikatmineralisation an der Oberfläche der adsorbierten Polyelektrolytlage. (vgl. Abb. I 6)

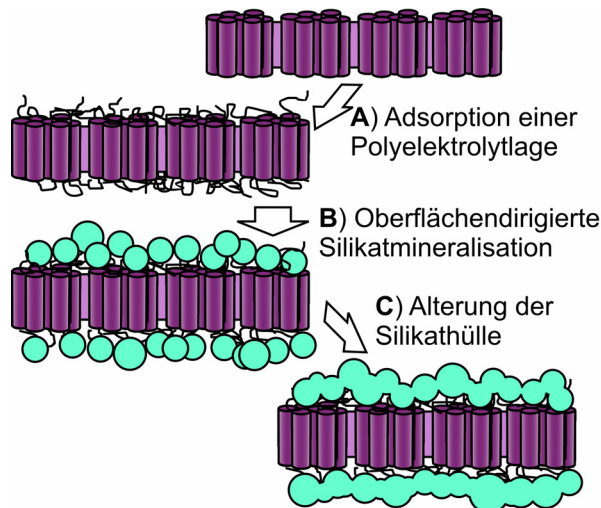


Abbildung I 6. Schematische Illustration der Präparationsschritte: (A) Adsorption einer Polyelektrolytschicht auf der entgegengesetzt geladenen PM-Oberfläche, gefolgt von (B) der templierten, durch die eingeführten Polyamine katalysierte Mineralisation. Nach Alterung (C) der Silikathaut stellt sie eine hohe Diffusionsbarriere dar.

Aus dem Wechselspiel verschiedener Phänomene wie Solvolyse, Säure-Basen-Gleichgewichten, Metastabilität und Phasenseparation, resultiert ein äußerst vielseitiges, *a priori* kaum vorhersehbares Verhalten der Sol-Gel-Chemie wässriger Silikat-lösungen.(84-86) Wegen des zu erwartenden Umfangs an zu testenden Bedingungen für die Verkapselung ist es notwendig, schnelle Testverfahren zur Verfügung zu haben.

Bakteriorhodopsin (BR) aus *Halobacterium salinarum* (4) erweist sich in dieser Hinsicht nicht nur deshalb als interessante Modells substanz, weil einige seiner Eigenschaften wie die Photochromie und der photoinduzierte Protonentransport direkten Bezug zu technischen Anwendungen haben, die von der stabilisierenden Wirkung einer Einkapselung profitieren könnten,(57) sondern gerade weil BR ein schnelles Screening zulässt:

I. Die natürliche Erscheinungsform des Membranproteins BR als ausgedehnter, kristalliner Membranbereich hat entscheidende Vorteile für die Strukturanalyse *via* Rasterkraftmikroskopie (AFM) und Transmissions-elektronenmikroskopie (TEM). BR war z.B. eines der ersten Membranproteine, das hochauflösend mit der AFM in Flüssigkeit abgebildet werden konnte.(51)

II. Seine optischen Eigenschaften (insbesondere die Photochromie) sind gut charakterisiert (57,58) und reagieren sensibel auf Veränderungen in der Mikroumgebung des BR, wie etwa die Gegenwart von Lösungsmitteln, die die kristalline Struktur der PM stören (87). Oftmals werden BR-Experimente an der populären Variante BR-D96N durchgeführt, da diese durch Substitution von Asp96 durch Asn eine gegenüber dem Wildtyp erhöhte Lichtsensitivität aufweist (60). Dadurch ist eine schnelle und einfache optische Bewertung der Porosität einer Verkapselung möglich.

III. Die Reinigung und Trennung von PM gestaltet sich sehr einfach: PM kann durch moderate Zentrifugation von löslichen Komponenten getrennt werden. PM-Banden im Dichtegradienten sind leicht anhand der purpurnen Färbung zu erkennen.

2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden experimentelle Details beschrieben, die für die Reproduktion nicht aber für das Verständnis der im Kapitel 3 vorgestellten Ergebnisse notwendig sind.

Viele der hier vorgestellten Experimente lassen sich nur unter gewissen Vorsichtsmaßnahmen hinsichtlich der Sauberkeit in einem normalen chemischen Labor durchführen. Gerade bei der Präparation von ultraglaten Oberflächen, deren Modifikation und Analyse mittels AFM ist es ratsam, Verunreinigungen nach Möglichkeit auszuschließen. Allgegenwärtige Staubkontaminationen zeigen sich als einzelne, meist deutlich größer als 100 nm auf der Oberfläche versprenkelte Partikel und sind leicht als solche zu erkennen. Sie ruinieren im schlimmsten Fall eine AFM-Sonde. Problematischer sind Tensidreste, die in der Regel vom Waschen der verwendeten Glasgeräte mit Spülmitteln herrühren. So wurden beispielsweise bei wenig sorgfältiger Präparation Kontaminationslagen unter 1 nm auf Glimmer gefunden. Diese verändern die Oberflächeneigenschaften dramatisch und sind auf weniger glatten Substraten, oder wenn man nach Strukturen einer anderen Größenordnungen sucht, leicht zu übersehen. Biologische Kontaminationen, wie sie bei der Verwendung alter Puffer auftreten, sind leicht anhand von zwar meist wenig hohen aber lateral ausgedehnten DNA-Protein-Aggregaten zu erkennen.

2.1 Chemikalien

Soweit nicht anders angegeben, wurden Chemikalien von Fisher Scientific (Leicestershire, UK), Aldrich (Taufkirchen, D) und Fluka (Buchs, CH) mindestens in der Reinheit *p.a.* bezogen und ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Soweit verfügbar wurden in Wasch- und Reaktionslösungen für die Oberflächenmodifikationen Lösungsmittel in HPLC-Qualität (Fisher Scientific, Leicestershire, UK) eingesetzt. Wässrige Lösungen wurden mit doppelt destiliertem Wasser angesetzt.

16-Mercaptohexadecansäure (90%, Aldrich, Taufkirchen, D) wurde mittels Säulenchromatographie über Silikagel mit dem Eluent Dichlormethan/Aceton (1:1 v/v, $R_f = 0.66$) und anschließender Umkristallisation aus Ethanol von Verunreinigungen gereinigt. 16-Mercaptohexadecansäure-2-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethoxy]-ethylester wurde wie von Tinazli *et al.*(42) beschrieben synthetisiert. Die Lagerung der Thiole

erfolgte unter Lichtausschluss bei -20 °C. Thiollösungen wurden zudem unter Ausschluss von Luftsauerstoff in argongesättigten Lösungsmitteln aufbewahrt.

Aliquots von Puffer- und Polymerlösungen wurden sterilgefiltert und bei -20 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2 Biomoleküle

Das MrgA wurde von Anke Morbitzer aus dem Arbeitskreis Essen (Universität Marburg) bereitgestellt, PM wurde von MIB bezogen.

2.2.1 MrgA

MrgA wurde heterogen in *E. coli* unter Autoinduktion bei 30 °C über 24 h exprimiert. Die geernteten Zellen wurden in einem auf pH 7.5 eingestellten Puffer (25 mM HEPES, 25 mM NaCl) resuspendiert. Nach Lyse der Zellen wurde der Überstand durch Erhitzen (85 °C für 10 min) denaturiert. Dabei bleibt das dodekamere Protein MrgA löslich, wohingegen sich die meisten *E. coli* Proteine durch Zentrifugation (5 min., 14.000 g) abtrennen lassen. Der Überstand, der das MrgA bereits relativ rein enthält (~80% Homogenität), wurde auf eine DEAE-Sepharose-Anionentauschermatrix aufgebracht. Das eluierte Material wurde mittels Vivaspin 6 Konzentratoren (10 kDa MWCO, Vivascience, Hannover, Deutschland) auf 40 mg/mL ankonzentriert. Im finalen Aufreinigungsschritt wurde eine vorgepackte Superdex S-200 HR Säule verwendet. Der ausgeprägteste *peak*, der dem dodekameren MrgA zugeordnet werden konnte, wurde gesammelt. Es wurde auf 10 mM HEPES (pH 7.5) umgepuffert und auf etwa 20 mg/mL konzentriert. Die genaue Proteinmenge wurde mittels eines modifizierten Bradford-Tests bestimmt.

Das eisenfreie und von anhaftenden DNA-Kontaminationen gereinigte MrgA wurde durch Rückfaltung erhalten. Dazu wurde eine Proteinlösung (1mg/mL) mit 0.7% einer 72%igen TCA-Lösung versetzt, das Präzipitat zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und in 6 M Guanidiniumchloridlösung aufgenommen. Die Probe wurde in einer Dialyse-Kassette (Slide-a-lyzer 3500 Da) gegen 10 mM HEPES (pH 7.5, 250 mM NaCl) dialysiert. Dabei fällt das Protein komplett wieder aus. Das Präzipitat wurde in einer geringen Menge 6 M Guanidiniumchloridlösung aufgenommen und durch Zugabe von 100 mL 10 mM HEPES (pH 7.5, 250 mM NaCl) präzipitiert. Unter Rühren wurde 50

mM Ammoniumsulfatlösung langsam eingespritzt. Dabei wurde das Protein komplett zurückgefaltet.

Um das Protein möglichst vollständig mit Eisen zu beladen, wurde folgendes Protokoll verwendet. Das MrgA wurde mit einer Konzentration von 1-2 mg/mL in einem HEPES-Puffer (pH 7.5, 100 mM HEPES, 250 mM NaCl) vorgelegt und 200 µL einer 0.5 M Ammoniumeisen(II)sulfat-Lösung zugegeben. In Gegenwart von Luftsauerstoff färbte sich die Lösung gelblich. Eventuell ausfallendes HEPES-Salz (dunkelgrün) und Eisenoxid wurden abzentrifugiert und die Lösung auf einem Konzentrator (Vivaspin 4, 10 kDa) konzentriert und mit Puffer (10 mM HEPES, pH 7.5, 250 mM NaCl, 5% Glycerin) gewaschen. Diese Prozedur wurde 3 bis 5 mal wiederholt. Die dunkelrote Lösung wurde dann über eine mit bidest. Wasser gespülte PD-10 Säule (GE Healthcare) salzfrei gewaschen (2x) und anschließend konzentriert.

MrgA wurde in destilliertem Wasser oder Puffer bei 4 °C bzw. in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert.

2.2.2 Isolation von Purpurmembranen

Purpurmembrane (PM) wurden entsprechend einer literaturbekannten Standardprozedur (48) präpariert und in destilliertem Wasser bei 4 °C oder im lyophilisiertem Zustand bei -20 °C gelagert.

2.3 Herstellung ultraglatte Substrate für die Proteinadsorption

In dieser Arbeit werden Techniken vorgestellt, mit deren Hilfe durch Molekülmonolagen nanoskalig strukturierte Oberflächen dargestellt werden können. Auf ihr Potential für den weiteren Aufbau von Strukturen im Sinne der „bottom-up“-Strategie mit Biomolekülen wird in Kapitel 3.1 ausführlich eingegangen.

Eine bedeutende Fragestellung in diesem Zusammenhang ist die Oberflächenanalyse. Die Rastersondenmikroskopie ist für die Lösung derartiger Problemstellungen geradezu prädestiniert. So lässt sich mit ihr prinzipiell jede Art von Wechselwirkung im Nahfeld detektieren. Voraussetzung für die erfolgreiche Charakterisierung von nanoskaligen Strukturen durch die AFM ist unter anderem eine geringe Mikrorauigkeit. Im Folgenden

wird die Herstellung von für diese Experimente ausreichend glatter Substrate ($R_{\text{RMS}} < 1$ nm) beschrieben.

2.3.1 Herstellung ultraglatte, unstrukturierter Substrate

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich auf drei verschiedenen Substrate konzentriert: Glimmer, Gold und Silizium. Diese Modellsysteme können kontaminationsfrei und als atomar flache Oberflächen dargestellt werden. Während sich die Variation der Oberflächeneigenschaften von Glimmer durch kovalente Oberflächenmodifikation äußerst schwierig gestaltet und in dieser Arbeit auf Physisorption verbrückender zweiwertige Kationen (Mg^{2+}) beschränkte, sind die hier als *template-stripped gold* (TSG) (88) eingesetzte Goldsubstrate einer wenig aufwendigen Modifikation durch chemisorption von Thiolen, die vielfach dichte, selbstassemblierte Monolagen (SAMs) ausbilden, zugänglich. Die aktive Siliziumoxidoberfläche der gereinigten Siliziumwafer kann durch Reaktion mit Triethoxyalkyl- und Trichloralkylsilane kovalent modifiziert werden.

Epoxy-verstärkte TSG-Substrate wurden in Anlehnung an eine von Wagner *et al.* publizierten Prozedur (88) präpariert. Auf frisch entlang der (001)-Ebene gespaltenem Muscovit Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) wurde im UHV (weniger als 10^{-4} Pa) langsam eine ca. 200 nm dicke Goldschicht (99.99 %, Degussa, Hanau, Deutschland) aufgedampft. Die fragile Goldschicht wurde durch Aufkleben eines Floatglasplättchens (1 cm x 1 cm) mit Epoxy-Klebstoff (*epo-tec 377*, Polytec, Waldbronn, Deutschland) mechanisch verstärkt. Das Aushärten des Klebers erfolgte bei 150 °C für 2 h. Die resultierenden Glas-Klebstoff-Gold-Glimmer-„sandwiches“ konnten bei Raumtemperatur ohne feststellbaren Qualitätsverlust gelagert werden. Unmittelbar vor Verwendung wurde das mechanisch verstärkte Gold als TSG mechanisch vom Glimmer getrennt. Gegebenfalls anhaftende Glimmerreste wurden mit Wasser vom TSG heruntergespült. Die auf diese Weise erhaltenen polykristallinen (111)-Goldoberflächen weisen in AFM-Messungen eine geringere Oberflächenrauigkeit R_{rms} als 0.6 nm auf. Der Klebstoff ist in den meisten Lösungsmitteln selbst im Ultraschallbad für die hier verwendeten Präparationsschritte ausreichend resistent gegen Aufquellen oder Abblättern der Goldhaut. Eine Ausnahme stellen aggressive Lösungsmitteln wie Chloroform und Dimethylformamid dar. In diesen Fällen wurde die in meiner Diplomarbeit (89) erarbeitete Methode der elektrolytischen Kupferverstärkung des TSG angewandt, die ungleich

aufwendiger ist, wenn man Kupferionen in den Reaktionslösungen von Oberflächenmodifikations-schritten ausschließen möchte.

Saubere Glimmeroberflächen für die Proteinadsorption wurden durch unmittelbar vor Verwendung entlang der (001)-Ebene gespaltenen Muscovit Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar, Deutschland) freigelegt.

Durch selbstassemblierte Thiol-Monolagen (SAM) modifiziertes TSG wurde unmittelbar vor weiterer Verwendung durch Einwirkung (3h) der entsprechenden 0.1 mM Thiollösungen in Ethanol und anschließend gründlichen Spülen der Oberfläche mit Ethanol und doppelt destilliertem Wasser präpariert.

Siliziumwafer wurden vor Verwendung in Piranha-Lösung (96% H_2SO_4 :30% H_2O_2 =2:1) gereinigt und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen. Die Aminierung der gereinigten Siliziumwafer erfolgte durch Einbringen der Oberfläche in eine refluxierende 2%igen Lösung von (3-Aminopropyl)-triethoxysilan (APTES) in Dichlormethan für 1h. Anschließend wurde die Oberfläche gründlich mit Dichlormethan und Wasser gespült. Für die Darstellung ausreichend glatter aminierte Oberflächen ist wasserfreies Arbeiten essentiell.

2.3.2 Mikrokontaktdruck zur Nanostrukturierung von TSG

Als Negativform für die Herstellung von μ CP-Stempeln bieten sich durch anisotrope Ätzung strukturierte Siliziumwafer an. Diese sind beispielsweise preiswert als periodisch mikrostrukturierte AFM-Standards im Handel. In dieser Arbeit wurde hauptsächlich ein großflächig mit periodisch angeordneten, quadratischen Vertiefungen versehener Standard als Negativform verwendet. (vgl. Abb. II 1)

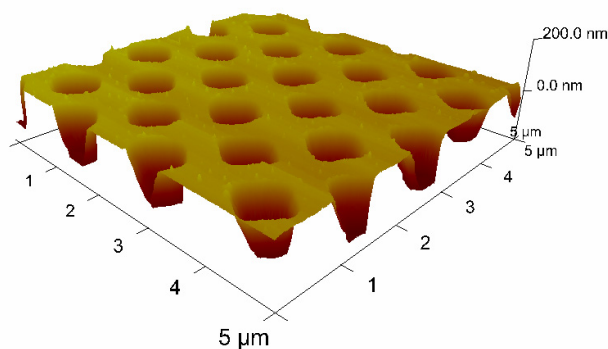


Abbildung II 1. TM-AFM-Aufnahmen eines AFM-Standards. Nach mehrmaliger Verwendung als Negativform für die μ CP-Stempelherstellung sind auf der glatten Oberfläche des Wafers leichte Verunreinigungen zu erkennen.

Als Elastomer für den μ CP hat sich das Poly(dimethylsiloxan) (PDMS) Sylgard 184 (DOW CORNING) bewährt. Das nach Herstellerangaben angesetzte, flüssige und gut durchmischte Silikon wurde für 30 min im Membranpumpenvakuum (ca. 50 mbar) entgast und auf die Negativform gegossen. Erneutes Entgasen für 30 min entfernte in den sehr kleinen Vertiefungen des Standards haftende Luftblasen. Nach 12 h Lagerung bei 60 °C war das Silikon vollständig ausgehärtet und konnte restlos (vgl. Abb II 1) vom Wafer abgezogen werden.

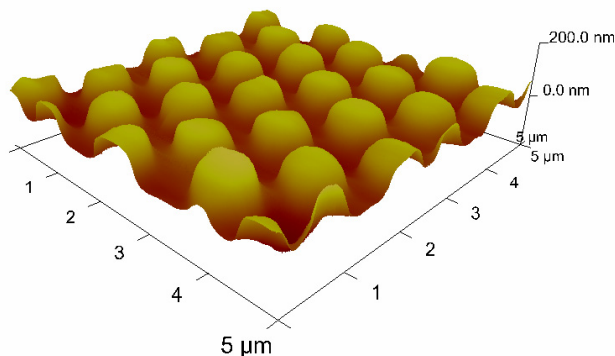


Abbildung II 2. TM-AFM-Aufnahmen eines von der in Abb. II 1 dargestellten Negativform abgeformten PDMS-Stempels.

Die hydrophobe Stempeloberfläche wurde zur besseren Benetzung durch ethanolische

Thiollösungen, welche als „Tinte“ eingesetzt wurden, im O₂-Niederdruckplasma hydrophilisiert. Statische Kontaktwinkelmessungen (25 µl H₂O, nach 30 s) unbehandelter und plasmabehandelter Silikonoberflächen ergaben eine signifikante Zunahme der Hydrophilie durch Plasmabehandlung (unbehandelt $112,6 \pm 0,4^\circ$, plasmabehandelt $36,2 \pm 1,2^\circ$). Durch die Plasmabehandlung bildet sich oberflächlich eine brüchige Silikatschicht aus.⁽⁹⁰⁾ Um diese zu schützen, wurden die Stempel bis zur weiteren Verwendung in destilliertem Wasser gelagert.

Vor dem eigentlichen Stempelvorgang wurden die Stempel gründlich mit Ethanol gewaschen und im Argonstrom getrocknet. Anschließend wurde auf die Stempeloberfläche ein Tropfen einer 0.1 mM bis 1 mM ethanolischen Thiollösung aufgebracht und nach 30 s Einwirkzeit im sanften Argonstrom zum Abperlen veranlasst. Der Stempel wurde nun ohne viel Druck in den Kontakt mit dem TSG gebracht. Es bietet sich an, ein feines, über einen Hohlzylinder gespanntes Drahtgitter in das noch flüssige Silikon zu bringen, so dass man später einen Griff für den Stempel erhält, der die bequeme Übertragung der Tinte in einer langsamen Rollbewegung auf das TSG ermöglicht. (vgl. Abb. II 2)

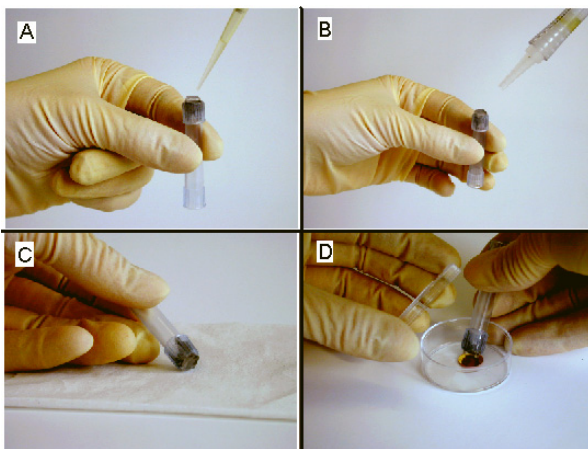


Abbildung II 3. Arbeitsschritte beim µCP: **A** Auf den Stempel wird ein Tropfen Thiollösung gegeben, der nach kurzer Einwirkzeit **B** heruntergeblasen wird. **C** Lösungsreste werden durch Abtupfen entfernt. **D** Der Stempel wird am TSG angesetzt und in einer langsamen Rollbewegung über die Goldprobe gekippt.

Um Kontaminationen durch in das Silikon diffundierende Thiole zu vermeiden, wurden die Stempel immer nur für einen Thioltyp verwendet. Die Resultate des µCP von Thiolen auf TSG wurde mittels hochauflösender AFM überprüft.

2.3.3 MrgA-Adsorption auf ultraglaten Substraten

Auf die gründlich mit dem für die Adsorption verwendeten Puffer gespülten Substrate wurde die Proteinlösung (1 bis 100 ng/µL, in verschiedenen Puffersystemen im pH-Bereich von 3.5 bis 7.5) aufgebracht. Nach einstündiger Einwirkzeit wurden die Proben

kurz mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet. (vgl. Kapitel 3) Die theoretisch für vollständige Bedeckung der glatten Substrate notwendige MrgA-Menge beträgt ca. 3.5 ng/mm². Alle Präparationen wurden mit Proteinlösungsvolumina durchgeführt, die deutlich über diesem theoretischen Wert lagen.

2.4 MrgA als Träger von Nanopartikel: Entfernung der Proteinhülle

Monolagen von adsorbiertem, eisenbeladenem MrgA wurden zur Freilegung der durch die Proteinhülle verkapselten Ferrihydrit-NP in einem O₂-Niederdruckplasma für 60s bei 50 Watt Plasmaleistung pyrolysiert. Die Vollständigkeit der Pyrolyse wurde mittels AFM-Messungen unterschiedlich lange plasmabehandelte Oberflächen überprüft.

2.5 Biomimetische Nanoverkapselung

Im folgenden Unterkapitel werden die Protokolle für die Anwendung der im Kapitel 1.3.3 vorgestellten Konzepte zur biomimetischen Verkapselung beschrieben.

2.5.1 Standardprotokoll für die Verkapselung von PM

Zu einer 10 mM wässrige Lösung von Ethylamin wurde soviel von einer 10 mM Zitronensäurelösung hinzugegeben, dass sich pH 5 einstellt. In 175 mL dieses salzfreien Ethylamin-Zitronensäure-Puffers wurden 1 g lyophilisierter PM suspendiert. Die PM-Suspension wurde langsam zu 175 mL einer gut gerührten Polymerlösung von 2mg/mL Poly(ethylenimin) ($M_w \sim 800$ g/mol) im Ethylamin-Zitronensäure-Puffer zugetropft. Nach zweistündiger Inkubation bei 37 °C wurde durch Zentrifugation (Sorvall, 10 min, 18500 rpm) und Resuspension in 350 mL Ethylamin-Zitronensäure-Puffer ungebundenes Polymer entfernt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Nach Abkühlen der Suspension auf 4 °C wurden 1800 µL Tetraethoxysilan (TEOS) hinzugegeben. Nach 1-12 Tagen wurde die Suspension durch Zentrifugation (Sorvall, 10 min, 18500 rpm) und Resuspension in Wasser gewaschen. Das verkapselte Material wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und Lyophilisiert.

2.5.2 Bestimmung der an PM adsorbierten Menge an PEI

500 µL einer PM-Suspension (5.70 mg/mL in 10 mM Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5) wurden langsam zu 500 µL einer PEI-Lösung (2 mg/mL PEI in 10 mM Phosphat-Citrat-

Puffer, pH 5) hinzugefügt. Nach 30 minütigem Annealen des Polymers an die PM bei 37 °C wurde zentrifugiert. Zu 500 µL des Überstandes wurden 250 µL einer 10 mM CuSO₄-Lösung (100 mM Phosphat-Citrat-Puffer, pH 5) gegeben, worauf sich rasch ein blauer Cu(II)-Komplex mit dem PEI im Überstand bildete. Nach Kallibrierung wurde die Absorption bei 638 nm für die quantitative Bestimmung der Menge an PEI im Überstand genutzt.

2.5.3 Stabilitäts- und Photochromietest von PM

Die optische Absorptionsbande bei 570 nm des nativen PM, die sich auf den B-Zustand von BR bezieht, ist ein guter erster Indikator dafür, ob sich das nanoverkapselte BR in einem funktional intaken Zustand befindet, einen weiteren Beleg für den Erhalt der biologischen Funktion des verkapselten Materials liefert die Messung seines Photochromismus.

Zur Evaluierung, ob die verkapselte PM seine photochromen Eigenschaften behält, wurden die UV-VIS-Spektren (UVICON 922, Kontron Instruments, Italy) einer Suspension des Hybridmaterials in 0.1 M Boratpuffer (pH 8.5) vor und unmittelbar nach Belichtung durch einbringen der Küvette in den Strahl eines Diaprojektors für 1 min gemessen.

Die verbesserte Stabilität gegenüber kleinen organischen Lösungsmitteln wurde anhand von EtOH-Zugabe überprüft. Dazu wurden in kurzen Zeitabständen nach EtOH-Zugabe die UV-VIS-Spektren des verkapselten PM im Reaktionspuffer aufgezeichnet. Diese Spektren zeigen einen erhöhten Streuuntergrund und wurden deshalb auf 800 nm normalisiert, wo PM keine Absorption aufweist.

2.5.4 Anwendung der Verkapselungsmethode auf anderer Oberflächen

Die für das PM entwickelte Verkapselungsmethode ist auf andere, negativ geladene Oberflächen übertragbar. Dies wurde anhand kommerziell erhältlicher, karbonsäurefunktionalisierter Latexpartikel mit einem Durchmesser von 400 nm und *single wall carbon nanotubes* (SWNT) demonstriert.

Zu einer 500 mM Zitronensäurelösung wurde soviel von einer 500 mM wässrigen Lösung von Ethylamin hinzugegeben, dass sich pH 4 einstellt. Zu 1 mL dieses salzfreien, auf 37°C erwärmten Ethylamin-Zitronensäure-Puffers wurden zunächst 10 µL einer 10%igen wässrigen Suspension von karbonsäurefunktionalisierten Latexpartikel (~0.2 mEq/g Carboxylat pro g Polymer, Sigma, Taufkirchen, D) und anschließend 3 µL einer wässrigen 50wt% Lösung von Polyethylenamin ($M_w \sim 2000$ g/mol) zugefügt.

Nach 1h bei dieser Temperatur und unter heftigem schütteln wurden die polymermodifizierten Latexpartikel durch Zentrifugation (Biofuge, 5 min, 5000 rpm) und Resuspension des als Zentrifugat erhaltene Gel im 1 mL Ethylamin-Zitronensäure-Puffer von ungebundenem Polymer getrennt. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt.

Durch Zuagbe von 10 µL des Kieselsäurevorläufers Tetramethoxysilan (TMOS) wurde die oberflächentemplierte Silikat-Mineralisation gestartet. Diese wurde nach 12-48 h bei RT und kräftigem Schütteln durch Zentrifugation (Biofuge, 5 min, 5000 rpm) und Resuspension des Zentrifugats in Wasser abgebrochen.

Um SWNT der Modifikation durch Polyelektrolytadsorption zugänglich zu machen, wurden diese gemäß einer Publikation von Liu (91) partiell zu ihren Carbonsäuren oxidiert werden.

Zu 20 mg des schwarzen SWNT-Pulvers (Sigma, Taufkirchen, D) wurden 40 mL einer 3:1 Mischung von konzentrierter Schwefelsäure (Oleum 96%) und konzentrierter Salpetersäure (98%) gegeben. Nach 3 h Reaktion bei 40°C im Ultraschallbad wurde die Suspension in 250 mL kühles Wasser gegeben und zweimal durch Zentrifugation (Sorvall, 20 min, 18500 rpm) und Resuspension in 500 mM Ethylamin-Zitronensäure-Puffer gewaschen. Die karbonsäuremodifizierten SWNT ließen sich sehr viel leichter in Wasser dispergieren als die unmodifizierten.

Zur Verkapselung wurden 20 µL der oxidierten SWNT-Lösung in 1 mL 500 mM Ethylamin-Zitronensäure-Puffer gegeben und 6 µL einer wässrigen 50wt% Lösung von Polyethylenamin ($M_w \sim 2000$ g/mol) zugefügt. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wurde zweimal durch Zentrifugation und Resuspension in 1 mL Ethylamin-Zitronensäure-Puffer gewaschen.

Durch Zuagbe von 10 µL Tetramethoxysilan (TMOS) wurde die Silikat-Mineralisation gestartet. Diese wurde nach 48 h bei RT und kräftigem Schütteln durch

Zentrifugation (Biofuge, 5 min, 5000 rpm) und Resuspension des Zentrifugats in Wasser abgebrochen.

2.6 Hochauflösende Analysemethoden

2.6.1 Elektronenmikroskopie

Proben für die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) wurden durch Aufbringen einer geeignet verdünnten Suspension der zu charakterisierenden Materialien in destilliertem Wasser auf ein kohlenstoffüberzogenes Kupfergitter (Plano GmbH, Wetzlar, Germany) präpariert. Für *holo*-MrgA erwies sich eine Präparation an der Luft-Wasser-Grenzfläche nach Yoshimura (92) als geeigneter.

Die TEM Messungen wurden an einem hoch auflösenden TEM (Jeol TEM 3010) betrieben bei 300 kV und ausgestattet mit einer 2 x 2 k slow scan CCD Kamera (Gatan), die einen Gadolinium-Oxysulphid-Puder-Phosphor-Scintillator nutzt, durchgeführt.

Für die lokale Durchführung der *energy-dispersive X-ray spectroscopy* (EDX) wurde ein Raster-Elektronen-Mikroskop (REM) mit einer Beschleunigungsspannung von 20 kV (Camsan CS 4 DV) verwendet. Die TEM-Proben wurden dazu mit leitfähigen Klebepads auf den entsprechenden REM-Probeträgern befestigt. Für EDX-Messungen war eine zusätzliche Kohlenstoffbedampfung nicht notwendig.

2.6.2 Abbildungen mittels Atomkraftmikroskopie

Da das AFM in den Nanowissenschaften inzwischen ebenso gut etabliert ist wie die Elektronenmikroskopie, wird an dieser Stelle auf eine genaue Erklärung der Funktionsweise eines AFMs verzichtet. Der interessierte Leser sein jedoch auf meine Diplomarbeit (89) verwiesen.

AFM-Messungen wurden mit einem Digital Instruments Multimode AFM (Veeco Instruments, Santa Barbara, U.S.A.), ausgerüstet mit einem Nanoscope IV controller und einem E-Scanner, durchgeführt. Alle Aufnahmen repräsentieren Rohdaten oder wurden nur minimal durch Manipulationen erster und zweiter Ordnung geglättet. Messungen wurden überwiegend im Tappingmode mit einkristallinen Siliziumsonden (RTESP, 250 kHz, NanoDevices, Veeco Instruments, Santa Barbara, U.S.A.) in Luft durchgeführt. Durch schrittweise Reduktion der Anregungsamplitude und manueller Korrektur der Anregungsfrequenz an die Feedbackresonanzfrequenz konnten in vielen Fällen sehr hohe Auflösung erzielt werden. (vgl. Kapitel 3) In diesem Spezialfall des Tappingmodes reißt

die sich zwischen der nur wenige nm oszillierenden Sonde und Probe ausbildende Kapillare nicht mehr ab, was sehr günstig für das Signal-Rauschen-Verhältnis ist.

Soweit nicht anders beschrieben, wurden die Proben für das AFM durch Aufbringen einer wässrigen Suspension des zu analysierenden Materials auf frisch entlang der (001)-Ebene gespaltenen Muscovite-Glimmer (Plano GmbH, Wetzlar, Germany) und anschließendem Trocknen hergestellt.

Die gezielte mechanische Beschädigung von Proben zur Freilegung innerer Schichten (vgl. Kapitel 3.2.1), konnte durch Reduktion der Feedbackparameter (integraler und proportionaler *gain*) und des Amplitude *set point* während der Messung um mehrerer Größenordnungen erreicht werden. AFM-Sonden mussten nach dieser manipulation der Probe gewechselt werden.

3. Ergebnisse und Diskussion

In den folgenden Unterkapiteln werden die experimentellen Ergebnisse vorgestellt und diskutiert. Experimentelle Details sowie Informationen zu den verwendeten Materialien und Methoden finden sich in Kapitel 2.

3.1 Adsorptionsexperimente mit MrgA

In diesem Kapitel vorgestellten Adsorptionsexperimenten wurde der Einfluss des pH und der Ionenstärke der Inkubationslösung auf die Oberflächenbedeckung und Morphologie von adsorbierten Monolagen des dodekameren, ferritinähnlichen Proteins MrgA aus *Bacillus subtilis* auf bezüglich ihrer Ladung und Hydrophilie unterschiedlichen Oberflächen untersucht. Durch Verwendung unterschiedlicher Substratmaterialien und der chemischen (z.B. durch die Reaktion von Thiolen mit Goldoberflächen) sowie physikalischen (z.B. auf Glimmer durch Zugabe zweiwertiger Kationen) Modifikation der Oberflächeneigenschaften können die Substratparameter ebenso leicht variiert werden wie die Parameter der Inkubationslösung (pH, Ionenstärke, Proteinkonzentration, etc.). Der Adsorption des Proteins aus Inkubationslösung auf den frisch hergestellten Substraten schloss sich ein Waschschriff an, wodurch nicht gebundenes Protein und überschüssiges Salz der Inkubationslösung entfernt wurde. Für die Diskussion ist wichtig, dass sich dadurch die physikochemischen Bedingungen während des Trocknens der Proben teilweise recht dramatisch von denen im Adsorptionsschritt unterscheiden, z.B. durch eine stark verminderte Debye-Abschirmungslänge.

Hochauflösende AFM-Messungen haben gezeigt, dass die quartäre Struktur des dodekameren MrgA während der Adsorption und des Trocknens der Proben generell nicht kollabiert. MrgA ist ein ungewöhnlich stabiles Protein, und relative extreme Bedingungen sind notwendig, um Dissoziation beobachten zu können. Selbst unter SDS-PAGE-Bedingungen findet keine vollständige Dissoziation des MrgA in seine Monomere statt. Auf Grund seiner rigiden, annähernd sphärischen Form weist die Adsorption von MrgA eher die Charakteristika geladener, harter Partikel als die des viel häufiger beobachteten Falls von Proteinen, welche sich auf dem Substrat verformen und denaturieren können, auf. Die für MrgA beobachteten Bedeckungsgrade stimmen qualitativ mit theoretischen (25, 93) Studien überein, in denen die Proteinadsorption als die Adsorption sphärischer geladener Partikel behandelt wird. Leider finden sich in der

Literatur nur wenige experimentelle Studien zur Proteinadsorption, bei der die quartäre Struktur der adsorbierten Proteine erhalten bleibt und die unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt wurden. Adsorbierte Lagen von Pferdemilz-Ferritin, das zu derselben Protein-Superfamilie wie das MrgA gehört, sich jedoch statt aus 12 aus 24 identischen Untereinheiten zusammensetzt, wurden in Flüssigkeit mittels *liquid tapping mode atomic force microscopy* (LTM-AFM) untersucht.⁽⁹⁴⁾ Die radiale Verteilung $g(r)$ und der Oberflächenbedeckungsgrad der feuchten Ferritin-Filme stimmten darin qualitativ gut mit den von *random sequential adsorption* (RSA) Simulationen für geladene Partikel überein. Im Gegensatz zu Johnsons Ergebnissen weisen die getrockneten MrgA-Monolagen eine geordnetere Morphologie auf, folgen aber denselben Trends bezüglich der Oberflächenbedeckung. Die von Nygren ⁽⁹⁵⁾ auf methylierten Quarzoberflächen gefundenen geclusterte Protein-Morphologien ähneln denen von trockenen MrgA-Lagen. Jedoch wurde keine Korrelation zwischen Morphologie und Substrateigenschaften hergestellt.

3.1.1 Morphologie von MrgA-Monolagen auf Glimmer

Um den Einfluss von Oberflächeneigenschaften, wie Hydrophilie oder Oberflächenladung, auf die Bindungscharakteristika zwischen Substrat und MrgA und den daraus resultierenden Morphologien zu studieren, wurden MrgA-Monolagen auf den unterschiedlichsten glatten Oberflächen präpariert. Die systematische Variation des pH-Werts als auch die Ionenstärke der Inkubationslösung gaben hierbei Hinweise für den Einfluss der Proteinladung auf seine Affinität zum Substrat.

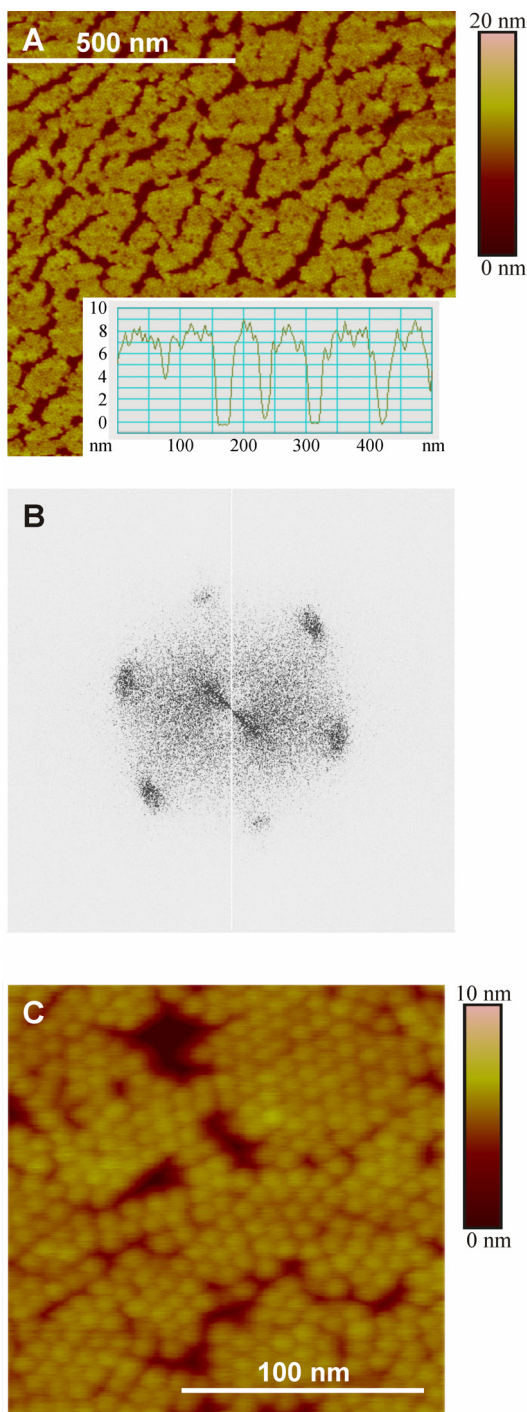


Abbildung III 1. TM-AFM-Aufnahmen (**A** und **C**) von MrgA-Monolagen auf Muscovit Glimmer und FFT-Analyse (**B**) über die gesamte TM-AFM-Aufnahme, die in (**A**) abgebildet wird. Die hier exemplarisch gezeigten Proben wurden durch Inkubation des Substrats mit einer 10 ng/μL Lösung von MrgA in 10 mM Tris Puffer (pH 5.0) dargestellt. Das hexagonale Gitter kann leicht anhand der hochauflösenden Aufnahme in (**C**) identifiziert werden. Das Höhenprofil in (**A**) ist in der Aufsicht durch eine weiße Linie markiert. Die aus dem vollständigen Bild aus (**A**) berechnete FFT-Analyse (**B**) zeigt, dass die kristalline Struktur über die gesamte Fläche von 1 μm² trotz einiger Spalten und Risse nahezu dieselbe laterale Orientierung aufweist. Der mittels FFT gemittelte laterale Protein-Protein-Abstand beträgt 9.0 nm.

Zunächst wurde Glimmer als Modellsubstrat für eine stark hydrophile, negativ geladene Oberfläche gewählt. Abb. III 1 A und III 1 C zeigen zwei typische TM-AFM-Aufnahmen kristalliner MrgA-Monolagen auf diesem Substrat. Das aus der Aufnahme III 1 A durch *2D fast fourier transformation* (FFT) gewonnenen Muster ist in Abbildung III 1 B dargestellt. Die hexagonale Symmetrie von MrgA-Monolagen ist nicht nur aus den *spots* der FFT, sondern auch direkt aus hoch auflösenden TM-AFM-Aufnahmen (Abb. III 1 C) leicht zu identifizieren. Die Höhenmessung in Abb. III 1 A zeigt, dass die Monolage eine Dicke von ungefähr 9 nm aufweist. Dieser Wert stimmt mit den aus Kristalldaten gewonnen Dimensionen von MrgA (9.04 nm) überein. Die FFT-Analyse der gesamten Aufnahme aus Abb. III 1 A (Abb. III 1 B) zeigt zwar keine besonders ausgeprägten Maxima, jedoch kann dadurch belegt werden, dass die Orientierung des 2D-Kristalls über die gesamte Fläche von 1 μm^2 ziemlich konstant bleibt, obwohl einige Gräben und Löcher die Monolage unterbrechen. Die auf diesem Substrat erhaltenen hexagonalen 2D-Kristalle von MrgA haben einen Protein-Protein-Abstand von 9.0 nm, der mittels FFT bestimmt wurde. Dieser Wert stimmt gut mit den schichtartig gestapelten Dps-Molekülen in der Einheitszelle dreidimensionaler Kristalle aus katalographischen Datensätzen Dps-ähnlichen Ferritine überein.(7, 96) Es ist wahrscheinlich, dass die Packung auf der Oberfläche durch dieselben Wechselwirkungen zwischen den Dodekameran bestimmt wird wie im 3D-Kristall. Abb. III 1 C zeigt eine AFM-Aufnahme einer weiteren Probe bei stärkerer Vergrößerung. Hier kann die hexagonale Packung leicht im Ortsraum identifiziert werden. Vergleichbar dichte Monolagen werden auf Glimmer in einem breiten Spektrum an Inkubationsbedingungen erhalten (pH 3.5 bis 8.0, Salzkonzentration 10 bis 100 mM). Glimmer scheint relativ unabhängig von diesen Parametern eine hohe Affinität zum MrgA aufzuweisen.

Bei Abwesenheit von Mg^{2+} konnte während intensiven Waschens Desorption des MrgA vom Glimmer beobachtet werden. Die reproduzierbare Präparation der Glimmerproben ist von der Art der Durchführung des Wasch- und Trockenschritts abhängig. Auf langsam getrockneten Proben (innerhalb von etwa 0.5 h) konnten teilweise dramatische Unterschiede in der Morphologie und Oberflächenbedeckung auf derselben Probe festgestellt werden. Neben den großräumig kristallinen und geclusterten Morphologien, die den MHDA-Proben ähneln (Abb. III 5), finden sich Regionen, die überhaupt keine Proteinbedeckung aufweisen.

Wir nehmen an, dass neben der Protein-Protein-Wechselwirkung, die innerhalb der dichten Proteinpäckung innerhalb der geclusterten Regionen die Ordnung bestimmt, vor

allem während des Trocknens (und Waschens) greifende Desorption-Adsorptionen und die lateralen Kräfte an der Flüssig-Gas-Grenzfläche die dominanten morphogenetischen Wechselwirkungen sind. Proben, die durch schnelles Trockenblasen getrocknet wurden, weisen eine homogenere Oberflächenbelegung auf, zeigen aber immer noch die charakteristischen Protein-Cluster.

3.1.2 Morphologie von MrgA-Monolagen auf modifiziertem TSG

Unter den Präparationsbedingungen, die auf Glimmer zu einer optimalen Oberflächenbedeckung geführt haben, zeigt sich auf blankem Gold keine Tendenz zur Ausbildung kristalliner Monolagen. Diese Beobachtung steht im Einklang mit Experimenten, die mit einem anderen Eisenspeicherprotein, dem Ferritin, durchgeführt wurden.⁽⁹⁷⁾ Die in dieser Arbeit in der Form als TSG eingesetzten polykristallinen, ultraglaten Goldoberflächen, lassen sich jedoch problemlos durch Chemisorption von Thiolen modifizieren. In vielen Fällen bildet sich nach kurzer Einwirkzeit von Thiollösungen eine sehr robuste und kristalline Thiolmonolage auf dem Gold aus. Die Präparation von selbstassemblierten Thiolmonolagen (SAMs) auf Gold ist inzwischen eine etablierte Methode, um die Oberflächeneigenschaften von TSG zu modifizieren.^(98-102, 43, 44) Zur Optimierung der Ausbildung hexagonal angeordneter MrgA-Monolagen auf SAM-modifiziertem TSG wurde die Zusammensetzung der Inkubationslösung (pH, Ionenstärke, MrgA-Konzentration) sowie die Oberflächeneigenschaften des Substrats durch Verwendung von Thiolen mit unterschiedlicher, an der Oberfläche exponierter Endgruppen systematisch variiert. Zur Substratmodifikation kamen carboxy-, hydroxy-, alkan-, perfluor-alkan- und oligoethylenglycol-terminierte Thiole zum Einsatz. (vgl. Abb. III 2)

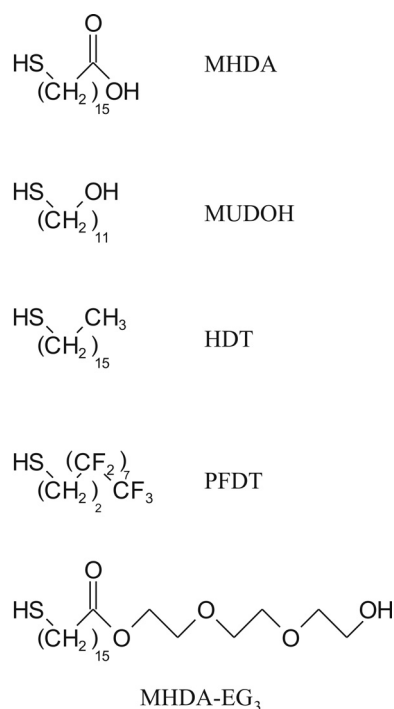


Abbildung III 2. Strukturformeln der zur Oberflächenmodifikation von Gold eingesetzten Thiole, 16-Mercaptohexadecansäure (MHDA), 11-Mercaptoundekanol (MUDOH), 10-Mercaptohexadecan (HDT), 1H,1H,2H,2H-1-Mercaptoperfluordekan (PFDT), 16-Mercaptohexadecansäure-2-[2-(2-hydroxy-ethoxy)-ethoxy]ethylester (MHDA-EG₃).

Für dieses Screening der Adsorptionsbedingungen wurden zunächst niedrige Proteinkonzentrationen verwendet. Diese führen zu einem geringeren Bedeckungsgrad und erleichtern so im Gegensatz zu Bedingungen, unter denen man fast vollständig mit einer Monolage bedeckten Proben erhält, Aussagen über den Einfluss des pH-Wertes und der Ionenstärke auf die Morphologie und Oberflächenbelegung. In Tabelle III 1 sind exemplarisch die Ergebnisse für fünf Substrate mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften und vier Inkubationslösungen, deren MrgA-Konzentration konstant bei 1 ng/μL MrgA lag, sich aber im pH-Wert und im Salzgehalt unterscheiden.

		Inkubationslösung			
		pH 5.0	pH 5.0, 20 mM MgCl ₂	pH 7.5	pH 7.5, 20 mM MgCl ₂
Substat	MHDA	++, a	+,c	-, c	+, c
	PFDT	++, a	++, a	+, a	++, a
	MUDOH	++, c	+, c	-, s	o, c
	HDT	+, a	+, a	o, a	+, a
	MHDA-EG ₃	--	--	--	--

Tabelle III 1. Bedeckung verschiedener Oberflächen nach Inkubation mit MrgA-haltigen Lösungen bei zwei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart und bei Abwesenheit von Mg²⁺ Kationen. Die Proteinkonzentration lag jeweils bei 1 ng/μL, gepuffert wurde mit 10 mM Tris. Belegungsgrad: ++ stark, + gut, o geringfügig, - vereinzelt, -- keine; Morphologie: c geclustert, s gesprenkelt, a amorph.

Abbildung III 3 zeigt zwei ausgewählte TM-AFM-Aufnahmen von Proben, die auf SAM-modifizierten TSG bei pH 5.0 hergestellt wurden. Während sich auf MHDA-Substraten eine amorphe MrgA-Lage abscheidet (Abb. III 3 A), wird das Goldsubstrat durch eine MHDA-EG₃-Monolage unter ansonsten gleichen Bedingungen wirksam vor Proteindeposition (Abb. III 3 B) geschützt.

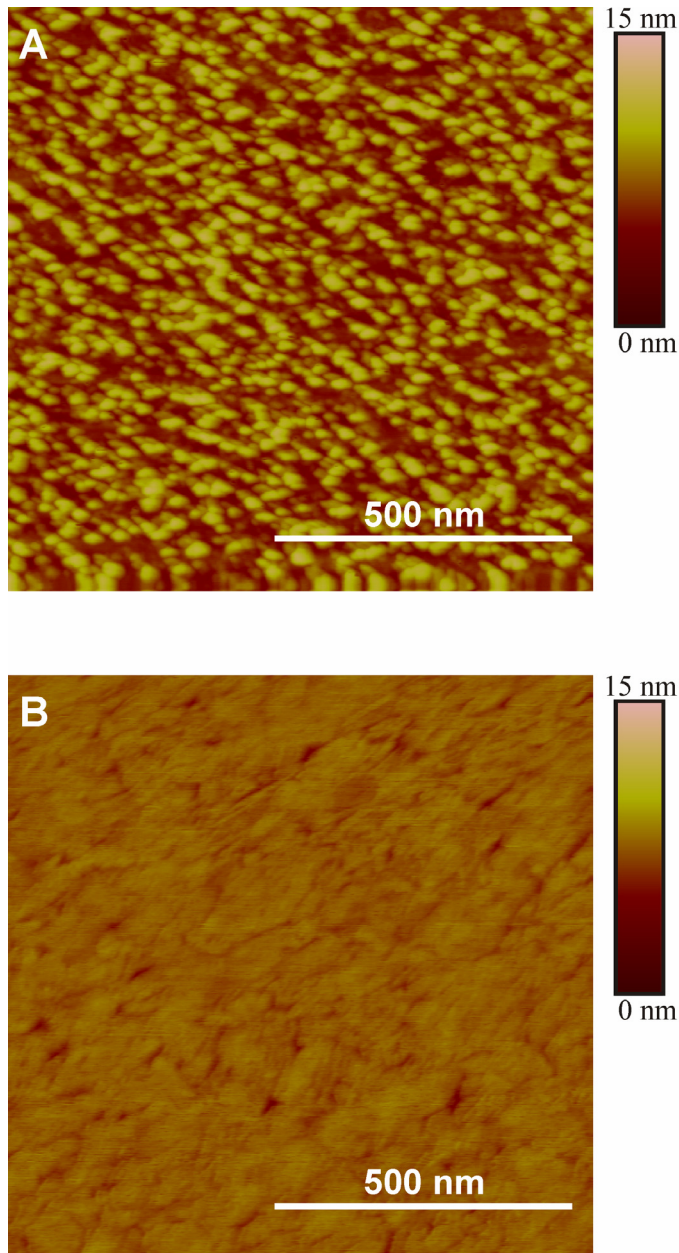


Abbildung III 3. TM-AFM-Aufnahmen von zwei SAM-modifizierten TSGs nach Inkubation mit einer MrgA-Lösung (pH 5.0, 1 ng/mL, 10 mM Tris). Auf den MHDA-Substraten erhält man eine dichte aber amorphe Proteinbelegung der Oberfläche (A). Auf den MHDA-EG₃-SAM-modifizierten TSG fand hingegen keine Proteinadsorption statt (B).

3.1.3 Tendenzen der MrgA-Adsorption

Im Screening-Adsorptionsexperiment mit verschiedenen thiolmodifizierten TSG-Oberflächen zeigten sich zwei Tendenzen:

I. Inkubationen bei pH-Werten nahe am isoelektrischen Punkt von MrgA (pI 4.6) führen zu einer dichteren Proteinbedeckung als solche, die bei einem weit darüber (oder darunter) liegendem pH-Wert (z.B. pH 7.5) durchgeführt wurden.

II. Während eine Erhöhung der Ionenstärke in der Nähe des isoelektrischen Punktes die Proteinbedeckung vermindert, steigt diese bei höherem pH-Wert mit der Ionenstärke an.

Bei pH-Werten nahe des isoelektrischen Punktes liegt MrgA nahezu ungeladen vor, bei pH 7.5 hingegen ist das Protein stark negativ geladen. Negative Ladungen sind dabei überwiegend an der inneren und positive an der lysinreichen äußeren Oberfläche des hohlkugelförmigen dodekameren Komplexes lokalisiert. Für ungeladene Partikel ist die elektrostatische Doppellagenabstoßung am geringsten und es wird dementsprechend die dichteste Oberflächenbelegung in der Nähe des pI, an dem Protein-Substrat-Wechselwirkungen attraktiv und die Protein-Protein-Abstoßung gering ist, erhalten. Bei kurzen Protein-Protein-Abständen treten zudem attraktive hydrophobe Wechselwirkungen auf, die die dicht gepackten Proteincluster stabilisieren. Repulsive elektrostatische Wechselwirkungen zwischen den Proteinen untereinander und zwischen Proteinen mit Substraten, die ein negatives Oberflächenpotential aufweisen, erklären den verminderten Bedeckungsgrad bei pH 7.5 und niedrigen Salzkonzentrationen.

Es ist literaturbekannt (103, 104), dass der pK_a -Wert von oberflächengebundenen Carbonsäuren verglichen mit gelösten Spezies signifikant erhöht ist. Demnach ist die Oberflächenladung von MHDA-Substraten im betrachteten Bereich stark abhängig vom pH-Wert. Noch bei pH 5 sind diese Oberflächen fast ladungsneutral, während sie bei pH 7.5 negativ geladen sind. So lässt sich qualitativ die pH-Wert-Abhängigkeit der Mengen an adsorbiertem MrgA auf den MHDA-Substraten bei niedrigen Salzkonzentrationen erklären.

Experimente mit MUDOH- und PFDT-Substraten, die ein negatives Oberflächenpotential besitzen, zeigen bezüglich der Oberflächenbelegung ähnliche Trends wie Glimmer oder MHDA bei pH 7.5.

Unter Adsorptionsbedingungen nahe des isoelektrischen Punktes bindet die positiv geladene äußere Hülle des Proteinkomplexes direkt an entgegengesetzt geladene Oberflächen wie Glimmer, MHDA-, PDFT- und MUDOH-Substraten. In diesem Fall wird die Annäherung des Proteins zum Substrat bei Erhöhung der Ionenstärke durch Ausbildung einer abstoßenden elektrostatischen Doppellage erschwert. Im Gegensatz dazu wird die Adsorption von MrgA bei pH 7.5 durch höhere Salzkonzentrationen erleichtert. Die besondere Wirksamkeit bezüglich der Adsorptionsvermittlung von Mg^{2+} -haltigen Puffern geht hierbei über das Abschirmen von Ladungen durch eine diffuse Ionenwolke hinaus. Wir vermuten, dass sich spezifische Kationenbrücken zum Substrat ausbilden. Es wurde bereits früher postuliert, dass diese Art von Kationen-Verbrückung der Hauptfaktor in der Dps-DNA-Wechselwirkung bei fast neutralem pH ist.(16) Unter Niedrigsalzbedingungen führt die Ladung in der Kontaktzone zwischen Protein und Oberfläche, da diese Region eine relative niedrige dielektrische Permeabilität aufweist, zu einem hohen elektrischen Potential, das die Adsorption stark benachteiligt.(105)

Auf hydrophoben Substraten wie dem HDT-modifizierten TSG wurden bei pH 5.0 stäbchenförmige Aggregate erhalten, deren Volumen in etwa der MrgA-Menge einer zu 30% durch eine dichte Proteinmonolage bedeckten Oberfläche entsprechen. Wir nehmen an, dass diese Strukturen durch Abperlen der nassen und viskosen Proteinmonolage entstehen. Interessanterweise konnte Derartiges nicht bei pH 7.5 präparierten Proben beobachtet werden. Hier wurden stets amorphe Monolagen erhalten. Diese vom pH-Wert abhängigen Unterschiede sind eventuell eine Folge der mit Änderung des pH-Werts einhergehenden Modulation der elektrostatischen Protein-Protein-Wechselwirkungen.

Die Tatsache, dass oberflächengebundene Polyethylenglycole die Proteinadsorption verhindern, ist seit langem bekannt.(106) Deshalb ist es kaum verwunderlich, dass auch MHDA-EG₃-SAMs in einem weitem Spektrum an physiochemischen Bedingungen die MrgA-Adsorption unterbindet. Der Grund für die außerordentlich starke proteinabweisende Wirkung von Polyethylengruppen ist gegenwärtig noch nicht erschöpfend geklärt.(107)

Wie durch vorangegangene Experimente gezeigt wurde, sind der pH-Wert und Ladungen wesentliche Faktoren für die Oberflächenbedeckung. Weiterführende Experimente an moderat hydrophilen Siliziumdioxidoberflächen von Wafern haben gezeigt, dass vollständige Proteinadsorptionsresistenz nicht nur durch geeignete physikochemische Bedingungen und Polyethylenglycolmodifikation des Substrates,

sondern auch durch Ändern der Oberflächenladung des Substrates durch Aminierung erzielt werden kann.

3.1.4 MrgA-Monolagen auf Siliziumwafer: Umpolung der Oberflächenladung

Die Oberfläche von Siliziumwafern lässt sich durch Reinigung mit Piranha-Lösung (96% H_2SO_4 :30% H_2O_2 =2:1) in eine aktive Oxidschicht überführen, die einer Modifikation durch aminterminierte Triethoxysilane zugänglich ist. Abbildung III 4 A zeigt eine auf der Oxidschicht eines Si-(100)-Wafers deponierten MrgA-Monolage. Die Oberfläche ist stark vom Protein bedeckt. Unter ansonsten identischen Präparationsbedingungen beobachtet man auf den durch (3-Aminopropyl)-triethoxysilane (APTES) veränderten Waferoberflächen keine Proteinadsorption (Abb. III 4 B), da durch die Aminierung die Oberfläche stark positiv geladen ist. Dies demonstriert klar, dass die Proteinadsorption über die Substratlading reguliert werden kann.

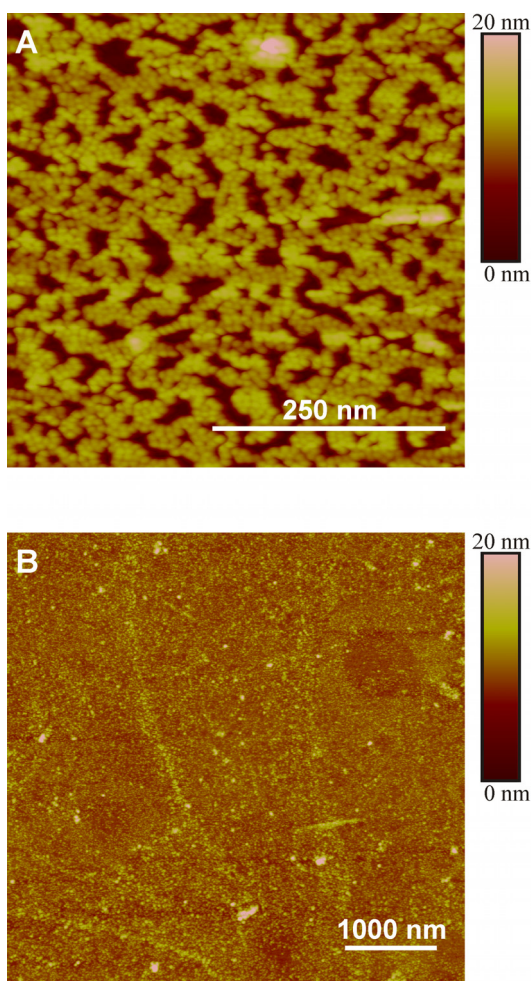


Abbildung III 4. TM-AFM-Aufnahmen zweier Siliziumoberflächen nach Inkubation mit MrgA (pH 4.0, 10 ng/mL, 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). (A) Gereinigtes Silizium; Proteincluster bedecken die Oberfläche. (B) APTES-modifizierte Siliziumoberfläche; kein Protein adsorbiert.

3.1.5 Optimierung der MrgA-Monolagen auf modifiziertem TSG

Nach experimenteller Klärung der allgemeinen Tendenzen der MrgA-Adsorption wurde eine zweite Serie an Experimenten gestartet, deren Zielsetzung die Darstellung dichter MrgA-Monolagen mit großen monokristallinen Bereichen war. Vorangegangene Ergebnisse weisen MHDA-modifiziertes TSG als einen in Hinblick auf Oberflächenbedeckung und Clusterbildung vielversprechenden Kandidaten aus. Ein weiterer Grund für die Fokussierung auf diese Oberfläche ist, dass sich TSG unter Laborbedingungen leicht mittels Mikrokontaktdruck (μ CP) durch SAMs mikrostrukturiert modifizieren lässt.⁽¹⁰⁸⁾

Da MrgA unterhalb des pI positiv geladen ist, wurden Inkubationsbedingungen nahe des pI und darunter gewählt. Wie in Abb. III 5 anhand von TM-AFM-Aufnahmen gezeigt wird, nimmt die Dichte der Proteinbedeckung mit steigendem pH-Wert zu (MrgA-Konzentration 10 ng/ μ L). Nahe am pI bilden sich teilweise größere vertikale Aggregate (pH 5.0). Auf unter identischen Bedingungen präparierten Glimmerproben wurden 0.2 μ m große Bereiche gefunden, in denen MrgA als hexagonale Doppellage adsorbiert wurde. Auf den MHDA-Oberflächen waren diese vertikalen Aggregate jedoch stets amorph. Um pH 4.0 wurde die vollständigste Oberflächenbedeckung ohne amorphe vertikale Aggregation erhalten.

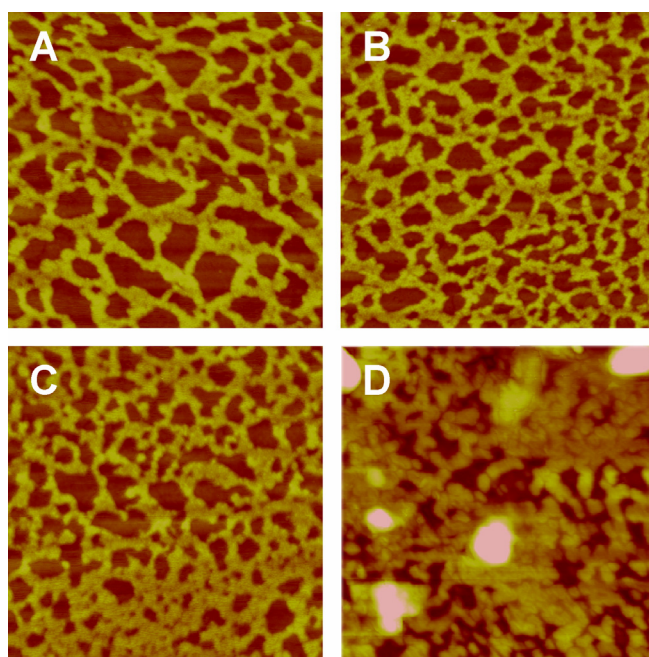


Abbildung III 5. Serie von TM-AFM-Aufnahmen (je 1 μ m²) verschiedener MrgA-Präparationen auf MHDA-modifizierten TSG. Die Bedeckung und Struktur der Adsorptionsschicht sind stark vom pH-Wert der Inkubationslösung abhängig. (A) pH 3.5, (B) pH 3.75, (C) pH 4.0 und (D) pH 5.0. Inkubationsbedingungen: 10 ng/mL MrgA, 0.1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$.

Präparationen bei höherer Proteinkonzentration führten erwartungsgemäß zu dichteren Adsorptionslagen. Allerdings trat schon bei einer MrgA-Konzentration von 100 ng/mL eine signifikante kolloidale Agglomeration in Lösung und auf den Oberflächen (Abb. III 6) auf. Hohe Proteinkonzentrationen führen zwar zu starker, jedoch amorpher Bedeckung.

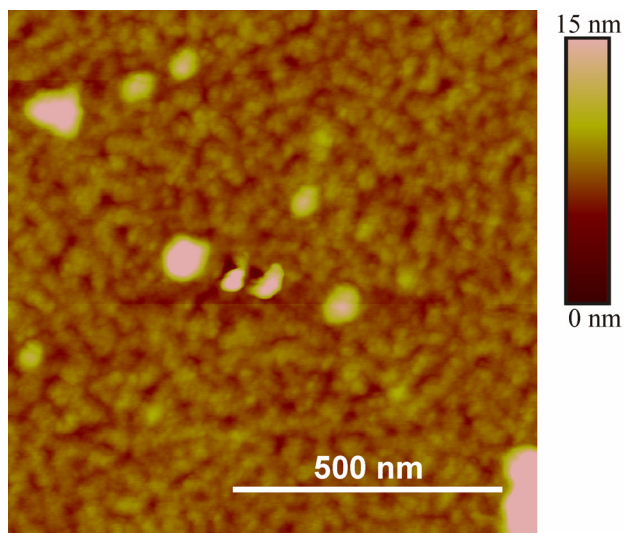


Abbildung III 6. TM-AFM-Aufnahme von MHDA-SAM auf TSG nach Inkubation mit einer MrgA-Lösung (pH 4,0, 100 ng/mL, 0,1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$). Die Oberfläche ist stark bedeckt, jedoch kann Agglomeration beobachtet werden.

Bei den auf MHDA-Substraten präparierten MrgA-Lagen wurde kein messbarer Einfluß der Wasch- und Trockenmethoden auf die Morphologie und Dichte beobachtet. Desorption trat nicht auf. Die auf diesem Substrat präparierten Proben waren gut reproduzierbar.

3.1.6 Vergleich der Adsorption auf unterschiedlichen Substraten

Im Gegensatz zum atomar glatten und fast defektfreien Glimmer besitzen die SAM-modifizierte Substrate eine weiche Oberfläche mit einigen Defekten in den SAMs und TSG. Dies führt zu einer größeren Kontaktfläche zwischen Protein und dem Substrat. Einige Proteine sind unter Umständen recht stark in ihrer Mobilität auf der Oberfläche eingeschränkt, während andere lateral diffundieren können. Obwohl auf Glimmer generell dichtere Adsorptionslagen erhalten wurden als auf den MHDA-Substraten, was auf eine stärkere Wechselwirkung im Adsorptionsschritt hinweist, konnte bei Entfernung verbrückender Ionen im Waschschriff Desorption im großen Umfang beobachtet werden, während auf den MHDA-Substraten überhaupt keine Desorption beobachtet wurde.

Interessanterweise blieb, wie durch FFT gezeigt wurde (Abb. III 1B), die kristalline Orientierung der MrgA-Lagen auf Glimmer selbst über „Korngrenzen“ hinweg bestehen. Auf den MHDA-Proben wurden kleinere, netzartige MrgA-Cluster, jedoch ohne solch eine weitreichende Vorzugsorientierung, gefunden, was in Anbetracht der niedrigeren lateralen Mobilität des MrgA und von Defekten im Substrat auch kaum zu erwarten war. Aus den gemessenen Gitterabständen lässt sich postulieren, dass in beiden Fällen innerhalb der kristallinen Bereiche auf den getrockneten Proben dieselben Wechselwirkungen zwischen den MrgA-Dodecameren wie im 3D-Kristall auftreten und demnach bevorzugte Flächen des dodekameren MrgA mit seinen Nachbarn und dem Substrat wechselwirken.

Obwohl die hier aufgeführten Ergebnisse bezüglich der Oberflächenbedeckung den Trends der LTM-AFM-Studie von Lenhoff (94) folgen, sind enorme Unterschiede bezüglich der beobachteten Morphologien offensichtlich. Während in der LTM-AFM-Studie versprenkelte Proteinverteilungen beobachtet wurden, weisen unsere Proben auf Glimmer-, Silizium- und den MHDA-Substraten eine geclusterte oder sogar eine kristalline Morphologie auf.

Im Gegensatz zu den auf MHDA-Substraten präparierten MrgA-Lagen reagieren die auf Glimmer präparierten Proben sensibel auf die Bedingungen der sich dem Adsorptionsschritt anschließenden Wasch und Trockenschritte.

3.1.7 Kristallisationsinduktion in adsorbierten MrgA-Monolagen durch Mg^{2+} -Ionen

Eine in der Präparation zusätzliche nach dem Adsorptionsschritt eingefügte einstündige Inkubation mit Mg^{2+} -haltigen Puffern hat gezeigt, dass die Desorption und 2D-Kristallisation durch Mg^{2+} -Konzentration moduliert werden kann. In Abwesenheit von zweiwertigen Kationen überwiegt die Desorption (Abb. III 7 A), die bereits bei 1mM Mg^{2+} Konzentration verhindert wird (Abb. III 7 B). Bei noch größeren Konzentrationen findet ein 2D-Kristallisationsprozess statt. Dieser deutet sich in Abb. III 7 C an: Die Monolage ist weniger gleichmäßig durch freie Bereiche durchzogen, es bilden sich bereits nach einer Stunde größere, wohl geordnete Bereiche aus. Bei der Inkubation mit 100 mM Mg^{2+} -Konzentration steigen der Ordnungsgrad und die Clustergröße beträchtlich an. (vgl. Abb. III 7 D)

Diesen kristallisationsinduzierenden Effekt des „Aussalzens“ auf der Oberfläche“ konnte auf MHDA-Substraten nicht beobachtet werden. Dies wird offenbar durch die fehlende Mobilität der feuchten MrgA-Monolage verhindert, während sich das MrgA-Adsorbat auf dem Glimmer eher wie eine Flüssigkeit verhält.

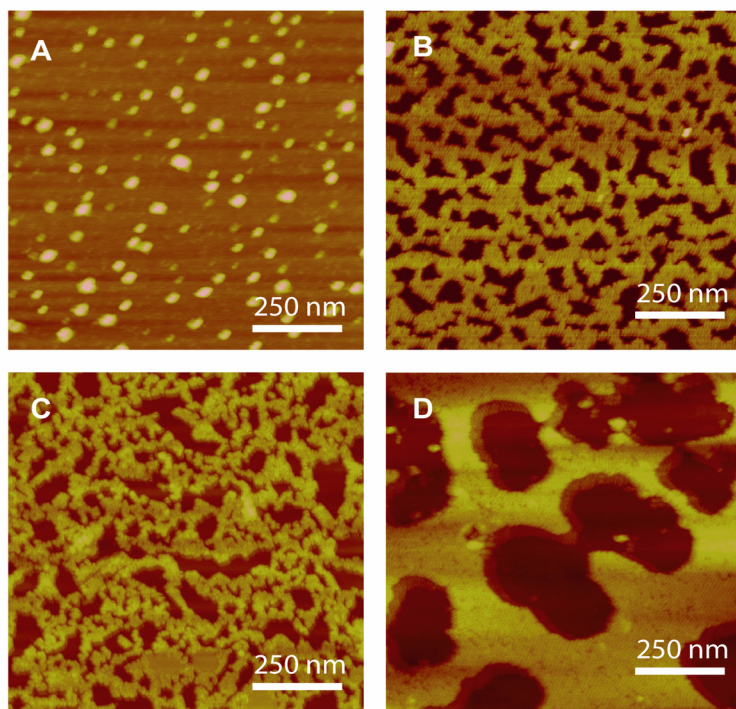


Abbildung III 7. TM-AFM-Aufnahmen von auf Glimmer durch MrgA-Inkubation (pH 4.0, 10 ng/mL, 0.1 M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) und daran anschließender einstündiger Einwirkung von Puffern mit unterschiedlichem Mg^{2+} -Gehalt präparierten Proben. Als Postadsorptions-Puffer wurden (A) 0 mM, (B) 0.1 mM, (C) 10 mM und (D) 100 mM MgCl_2 in 10 mM Tris bei pH 7.0 eingesetzt.

3.1.8 Mikro- und nanostrukturierte MrgA-Monolagen

Durch SAMs vollständig bedeckte, mesostrukturierte Substrate wurden durch μCP (108) einer Thiollösung auf dem ultraglaten TSG gefolgt von der Inkubation des bedruckten TSGs mit einer Lösung eines Thiols mit anderer Endgruppe hergestellt. Für den μCP sowie den Inkubationsschritt wurden ethanolische Lösungen von MHDA und MHDA-EG₃ eingesetzt. Aus vorangegangenen Experimenten kann geschlossen werden, dass die auf diese Weise hergestellten heterogenen, durch unterschiedliche SAM strukturierten Oberflächen einen hohen Kontrast in ihrer Affinität zu MrgA aufweisen.

Die durch MHDA-Einwirkung auf TSG hergestellten SAM-modifizierten Substrate sind ein vielversprechender Kandidat in Hinblick auf 2D-Kristall-/Clusterbildung und Oberflächenbedeckung durch MrgA-Adsorption. Die analogen MHDA-EG₃-Substrate bieten Proteinadsorptionsresistenz unter einem weiten Spektrum an Inkubationsbedingungen.

Beim μ CP mit niedrigen Tintenkonzentrationen findet die Thiolübertragung vom Stempel auf das TSG dominant an den Rändern der Stempelstrukturen statt. Dies wurde für beide Tinten, 0.1 mM MHDA (Abb. III 8) und 0.1 mM MHDA-EG₃ (nicht gezeigt), beobachtet. Abb. III 8 zeigt solch einen randdominanten μ CP von MHDA auf TSG, der mit einem PDMS-Stempel mit periodischen Strukturen einer Periodizität von 1 μ m durchgeführt wurde. Der Druck weist Ränder mit einer gemessenen Höhe von ~ 2.5 nm und einer Breite von ca. 50 nm auf, während auf den Kontaktflächen im Inneren der gestempelten Strukturen das Thiol lediglich zu einer mittleren Höhe von ~ 0.7 nm übertragen wurde. Geschlossene MHDA-SAM weisen eine Dicke von 1.1 nm auf.⁽¹¹⁰⁾ Die Ränder sind demnach etwas dicker als eine Monolage, während es sich beim inneren Bereich um eine Submonolage, d.h. eine nicht geschlossene Monolage, handelt.

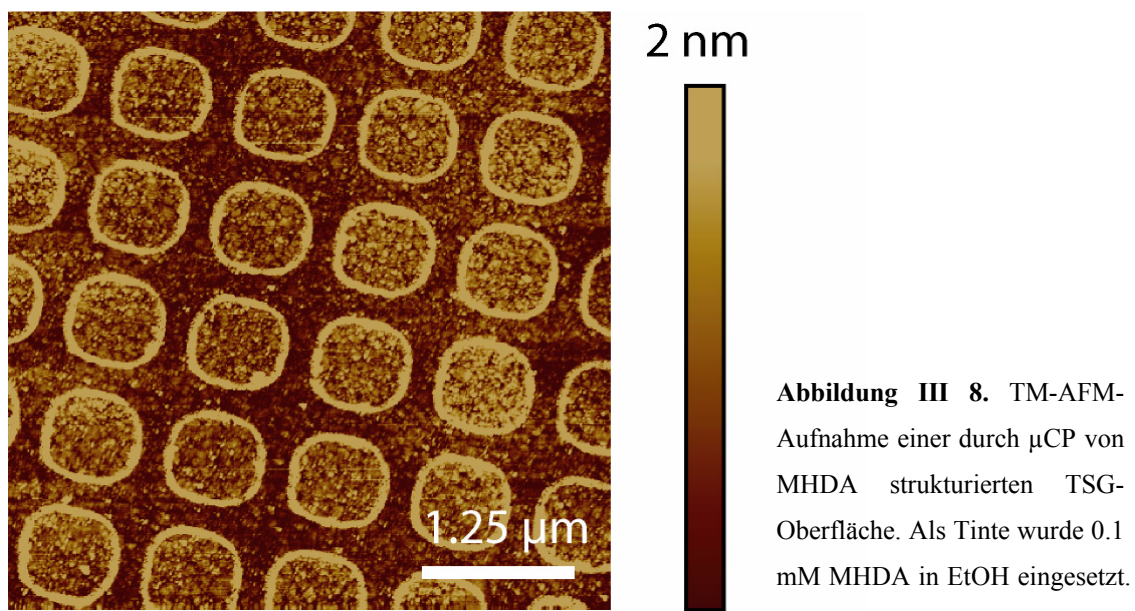


Abbildung III 8. TM-AFM-Aufnahme einer durch μ CP von MHDA strukturierten TSG-Oberfläche. Als Tinte wurde 0.1 mM MHDA in EtOH eingesetzt.

Die präzise Messung der weichen Topographie der bestempelten TSGs mittels AFM (wie in Abb. III 8) ist sehr knifflig und gelang erst nach Reduktion der Sondenamplitude im Tapping Mode um mehrer Größenordnungen (auf wenige nm) im Vergleich zu normalen Messmodi auf harten Oberflächen und manueller Anpassung der Anregungsfrequenz während sich die Sonde im Feedback zur Oberfläche befand.

Unter Ausnutzung der kürzlich beschrieben, nur wenig verstandenen Randdominanz des μ CP ^(111, 112) gelang die Darstellung nanostrukturierter Oberflächen durch μ CP, ohne dass dabei die üblichen Probleme des konventionellen μ CP derartig kleiner Strukturen auftraten. Bei Verwendung niedriger Tintenkonzentrationen wird dieser phänomenologisch als Spreiten beschriebene „Fehler“ beim μ CP zu einer

kontaktzeitunabhängigen (III) und damit reproduzierbaren Methode der Nanostrukturierung.

Die unbedruckten Bereiche auf dem TSG wurden nach dem μ CP durch Inkubation mit einer 0.1 mM ethanolischen Thiollösung des in seiner Affinität zum MrgA komplementären Thiols bedeckt. Auf diese Weise gelangt man zu den durch zwei Thiole bedeckten, nanostrukturierten Substraten, die für die Amplifikation ihrer unterschiedlich affinen Bereiche durch MrgA-Adsorption herangezogen wurden. Für die erfolgreiche Amplifikation ist die Einstellung der Wechselwirkung über den pH-Wert und Ionenstärke von essentieller Bedeutung. Bei pH 5, was nahe am pI von MrgA liegt, erhält man beispielsweise Proteinmonolagen, die denen auf lediglich durch MHDA-modifizierten Substraten ähneln und in keinsten Weise erkennen lassen, dass das verwendete Substrat strukturiert ist.

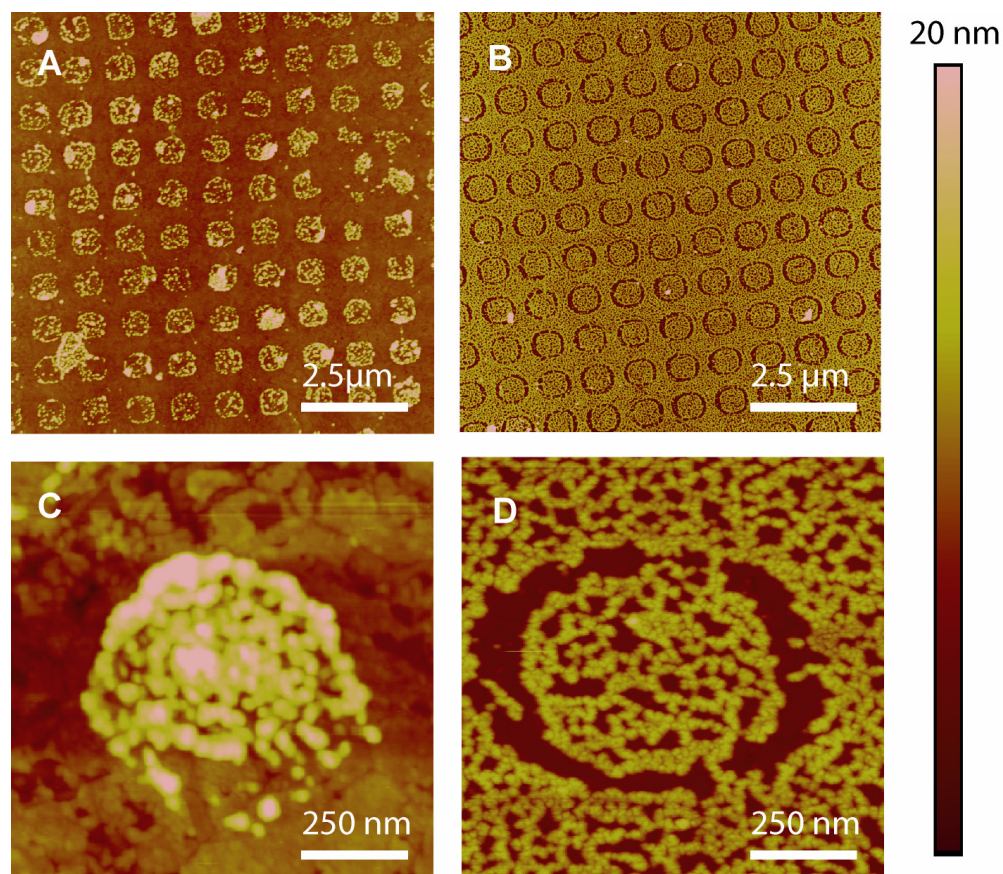


Abbildung III 9. TM-AFM-Aufnahme von durch MrgA-Adsorption amplifizierten Nanostrukturen der durch MHDA- und MHDA-EG₃-modifizierten Substrate. Die Adsorption wurde bei einer MrgA-Konzentration von 10 ng/mL in 0.1M NH₄H₂PO₄ bei pH 3.5 durchgeführt. Die Aufnahmen **A** und **C** zeigen die durch μ CP von MHDA hergestellten Proben, während bei **B** und **D** MHDA-EG₃ gestempelt wurde.

In Abbildung III 9 sind TM-AFM-Aufnahmen von solchen durch MrgA-Adsorption amplifizierten Template abgebildet, die durch μ CP von MHDA (Abb. III 9 A und C) bzw. MHDA-EG₃ (Abb. III 9 B und D) hergestellt wurden. Es ist leicht zu erkennen, dass eine Submonolage von MHDA die Adsorption unterstützt, während das Gegenteil für die proteinresistiven Eigenschaften von MHDA-EG₃ gilt. Die Adsorption wurde dabei unter physikochemischen Bedingungen (10 ng/mL MrgA in 0.1M NH₄H₂PO₄, pH 3.5) durchgeführt, die für lediglich durch MHDA-SAM modifiziertes TSG eine dichte, netzartig verknüpfte MrgA-Monolage aus kristallinen 2D-Clustern mit einem Durchmesser von ca. 100 nm erwarten lassen. Das Puffersystem enthält dabei keine bivalenten Kationen, deren Verwendung für die Anwendbarkeit dieser Methode in der Darstellung von Halbleiter-Bauelementen einen kritischen Nachteil darstellen würde.

Nach dem Modell von Denkov (29) wurde erwartet, dass die Kapillarkräfte während des langsamen Trocknens der noch feuchten MrgA-Monolagen auf den strukturierten Templaten zu einer erhöhten Kristallinität führen. Bei den durch μ CP von MHDA (Abb. III 9 A und C) hergestellten Proben wurden allerdings nur amorphe MrgA-Lagen erhalten. Auch die MHDA-EG₃-Proben (Abb. III 9 B und D) weisen gegenüber den unstrukturierten Proben keinen erhöhten Ordnungsgrad auf.

Da nicht auszuschließen ist, dass dies an den Dimensionen der Strukturen liegt, wurde eine analoge Probe durch konventionelles μ CP (1 mM Tintenkonzentration) mit um zwei Größenordnungen größeren Strukturen hergestellt und durch wiederholtes aufkondensieren von Wasser und langsames Trocken überprüft, ob und in welchem Umfang Kapillarkräfte auf den strukturierten Proben strukturierend wirksam sind. In Abbildung III 10 sind die AFM-Aufnahmen eines unvollständig durch MrgA bedeckten Randbereichs einer solchen Probe in einer Sequenz von Benetzungs- und Trockenschritten dargestellt.

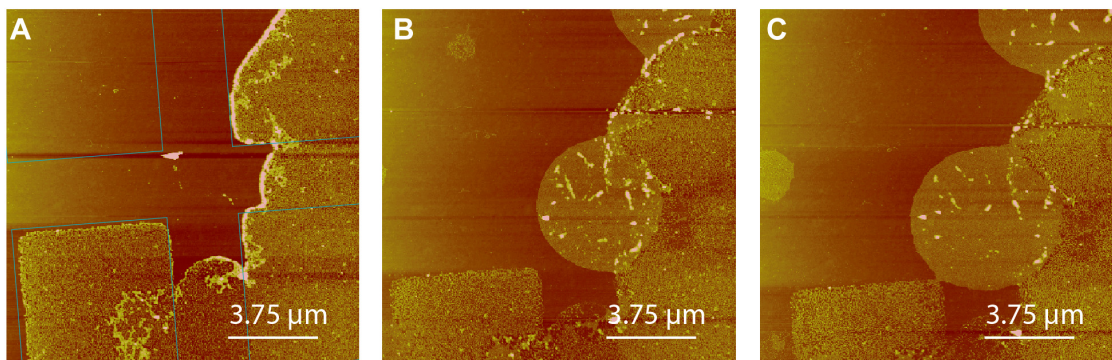


Abbildung III 10. Sequenz von TM-AFM-Aufnahmen derselben Probe nach keinen (A), zwei (B) und mehr als 10 (C) zusätzlichen Trockenschritten. Die Substrate für die Proteinadsorption wurden durch μ CP von MHDA und anschließender Inkubation mit MHDA-EG₃ mikrostrukturiert, die Adsorption der Proteinschicht wurde bei einer MrgA-Konzentration von 10 ng/mL in 0.1M NH₄H₂PO₄ bei pH 3.5 durchgeführt. In Aufnahme A sind die bestempelten Strukturen durch blaue Linien hervorgehoben.

Wie sich recht deutlich an der konzentrischen Formen der sich in diesem Prozess neu bildenden MrgA-Monolagen (Abbildung III 10 C) zeigt, gibt es bei derartigen Substraten keine dirigierende Wirkung durch Kapillarkräfte. Dies kann mehrer Ursachen haben:

I. Durch Waschen der Probe ändern sich die Bedingungen so stark, dass kein ausreichend hoher Affinitätskontrast mehr besteht.

II. Der Kontrast in der Hydrophilie ist nicht ausreichend groß und geht bei unselektiver Adsorption (Punkt I) völlig verloren, da die MrgA-Monolage nun die Hydrophilie der Oberfläche bestimmen.

III. Eventuell ist die Bildung geordneter Schichten in diesem Prozess auf den wenig affinen Bereichen des Substrats kinetisch begünstigt, da dort die 2D-Mobilität des MrgA höher ist.

3.1.9 MrgA als Träger für Nanopartikel

Wie vorangegangene Experimente gezeigt haben, lassen sich MrgA-Monolagen auf geeigneten Substraten durch Adsorption aus Lösung strukturiert bis in den Nanometerbereich aufbringen. Analog zum Apoferritin,(35-39) das zu derselben Protein-Superfamilie zählt, ist auch MrgA fähig verschiedene Übergangsmetalle zu mineralisieren. Dabei ist die Größe der entstehenden Nanopartikel auf das Volumen des hohlkugelförmigen Innenraums des Proteinkomplexes beschränkt, weshalb man sehr homogene, auf anderen Wegen schwer zugängliche Nanopartikel erhält. Das aus 24 identischen Untereinheiten bestehende Apoferritin synthetisiert hierbei etwa 7 nm große Partikel, während die Größe entstehender Partikel im dodekameren MrgA auf ca. 3.5 nm beschränkt ist.

Das Potential von MrgA (als Biomineralisator) und Träger von Nanopartikeln wurde exemplarisch durch Eisenbeladung gezeigt, welches als Ferrihydrit mineralisiert wird. ICP-MS-Bestimmungen ergab einen Eisengehalt von 3.4% bei Präparationen mit einem Überschuss an Fe^{+2} . Die Ausarbeitung der Protokolle für die Übergangsmetalloxid-Biomineralisation durch MrgA gehen auf Anke Morbitzer (Arbeitskreis Essen, Universität Marburg) zurück und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.(40)

Bei den Adsorptionsexperimenten vorrangiger Unterkapitel hatte der Beladungsgrad des Proteins durch Eisen keinen Einfluss auf das Adsorptionsverhalten, da die hierzu ausgenutzten Wechselwirkungen überwiegend unspezifischen Charakter haben, d.h. von elektrostatischen, kapillaren und entropischen Kräften dominiert werden, die alle unmaßgeblich von den geringen strukturellen Veränderungen der exponierten äußeren Hülle des dodekameren Proteinkomplexes bei der Einlagerung von Eisen als Ferrihydrit beeinflusst werden. Die Proteinhülle ist nicht nur für die Löslichkeit verantwortlich, sondern verhindert auch die Aggregation der eingeschlossenen Nanopartikel. Berücksichtigt man zudem, dass die meisten dps-Proteine außergewöhnlich stabil sind, erscheint diese Klasse von Proteinen als ein sehr nützliches Werkzeug in der Handhabung und Präparation kleiner Nanopartikel.

Abbildung III 11 A zeigt die typischen netzartigen Strukturen von adsorbiertem MrgA auf MHDA-modifizierten Goldoberflächen. Im O_2 -Niederdruckplasma (60 s, 50 Watt) lässt sich die Proteinhülle restlos oxidativ entfernen. Dabei verbleiben die eingeschlossenen Nanopartikel auf der Oberfläche. (vgl. Abb. III 11 B) Die mittels AFM gemessene Höhe dieser Partikel liegt bei 2.71 ± 0.25 nm. Der Abstand zwischen den

Partikeln beträgt ca. 9 nm, sie behalten den durch die Protein-Monolage vorgegebenen Abstand zueinander. Die analog durchgeführten Kontrollexperimente mit Apo-MrgA ergeben nach Plasmabehandlung blanke Oberflächen, die nur noch die Strukturen des TSG aufweisen. Auch hochauflösende TEM-Aufnahmen von beladenem MrgA belegen, dass es sich bei den ca. 3 nm Partikeln um gut streuendes, kristallines Material, also nicht um Proteinreste handelt. (vgl. Abb. III 11 D)

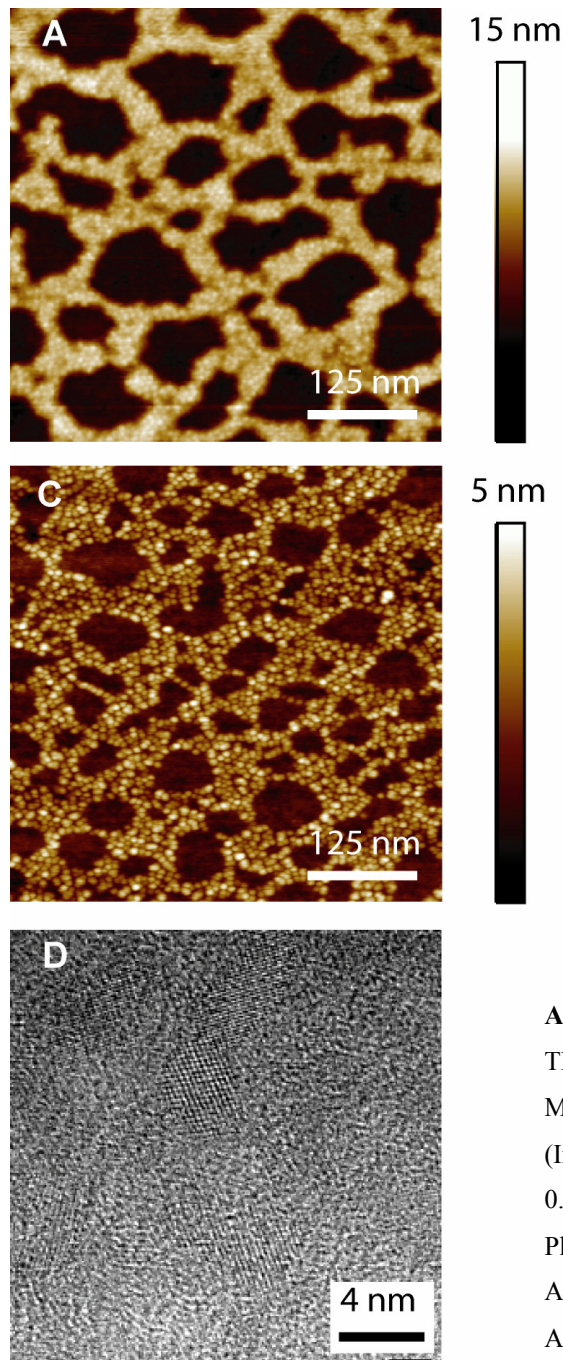


Abbildung III 11. Entfernen der Proteinhülle. TM-AFM-Aufnahme (A) einer Präparation einer MrgA-Monolage auf MHDA-modifiziertem TSG (Inkubationsbedingungen: 10 ng/mL MrgA in 0.1M $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ Puffer bei pH 3.5) und (C) nach Plasmabehandlung derselben Oberfläche. Abbildung (D) zeigt eine hochauflösende TEM-Aufnahme von eisenbeladenem MrgA.

3.1.10 Übertragbarkeit der Adsorptionsexperimente auf andere Proteine

Auf Grund der enormen Diversität der physikalischen und chemischen Eigenschaften von Biomolekülen ist der Anspruch auf Universalität einer neuer Methode ein hoch gestecktes Ziel. So lässt sich die vorgestellte Nanostrukturierung von Oberflächen durch gerichtete Adsorption von MrgA zwar vermutlich auf andere ferritin-analoge Proteine übertragen, in Kontrollexperimenten mit Lysozym aus Eiweiß (PDB-ID: 3LZT) ($pI \sim 5.6$) zeigten sich jedoch völlig andere Trends in Adsorptionsverhalten und Morphologie.

Unter Adsorptionsbedingungen um den pI von Lysozym wurden selbst bei 1000-fach höherer Proteinkonzentration ($10 \mu\text{g/mL}$) keine Monolagen auf MHDA-modifiziertem TSG gefunden. Monolagen wurden erst auf der hydrophoben HDT-SAM-Oberfläche bei niedrigen Salzkonzentrationen erhalten. Diese weisen eine fraktale Morphologie auf. (vgl. Abb. III 12)

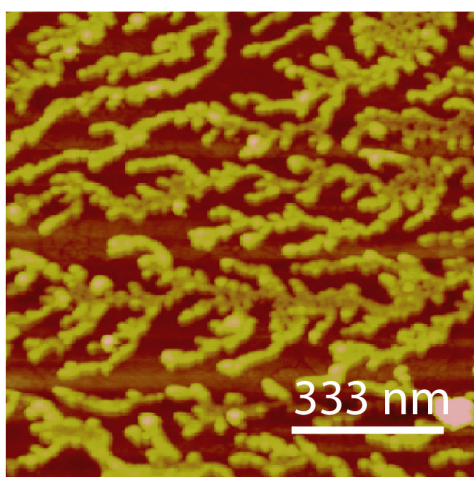


Abbildung III 12. TM-AFM-Aufnahme einer Lysozymmonolage auf HDT-modifiziertem TSG-Substrat. Inkubationsbedingungen: $10 \mu\text{g/mL}$ Lysozym in 10 mM NaAC -Puffer ($pH 4.6$).

Die anderen Trends im Adsorptionsverhalten, die gefundenen, fraktalen Adsorptions-Morphologien, seine asymmetrisch ellipsoide Form (und kleinere Dimensionen) machen es recht unwahrscheinlich, dass hier der gleiche Mechanismus der Adsorption wie bei MrgA mit anderer Gewichtung der Wechselwirkungen vorliegt. Es ist anzunehmen, dass ein durch einfache Modelle beschreibbares Verhalten der Proteinadsorption wie beim MrgA eher die Ausnahme als die Regel ist. (vgl. hierzu auch Kapitel 3.1)

3.2 Biomimetische Nanoverkapselung von PM und anderen Modellsubstanzen

In diesem Kapitel wird eine Methode zur oberflächentemplierten Mineralisation auf polyelektrolytmodifizierten Oberflächen anhand des biologischen Bausteins PM entwickelt und mit hochauflösenden Methoden charakterisiert. Es wird demonstriert, dass sich die in der Methode verwendeten Präparationsschritte auch auf andere Modelloberflächen übertragen lassen.

3.2.1 Biomimetische Nanoverkapselung von PM: Entwicklung einer Methode

Das bereits für kolloidale Partikel und andere Oberflächen etablierte Konzept der Polyelektrolytlagenadsorption (74-76) wurde auf die blattförmige PM angewandt. Da PM in Gegenwart von Polykationen eine ausgeprägte Tendenz zur Aggregation zu makroskopischen Schichtstrukturen, die durch Stapelung von PM entstehen, zeigt, ist eine genaue Einstellung des pH und die Zusammensetzung des Puffers der Adsorptionslösung für die Darstellung einer feinen Dispersion von einzelnen durch eine Polymerlage ummantelte PM-sheets notwendig. Das hier verwendete Polyethylenimin (PEI) kann beispielsweise unter anderen Bedingungen gezielt als „Klebstoff“ für den sequentiellen Aufbau von PM-Schichtstrukturen genutzt werden.(113)

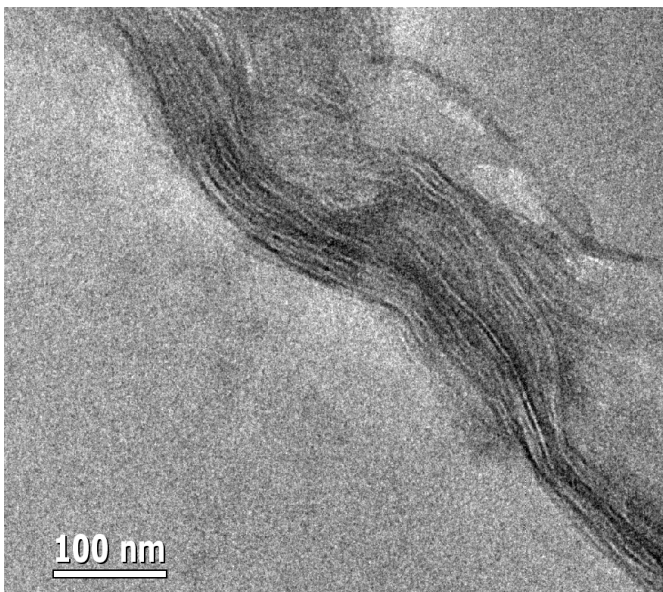


Abbildung III 13. TEM-Aufnahme eines ultramikrotomischen Schnittes durch ein PM-Aggregats, wie es bei Verwendung hochmolekularen PEI (MW ~ 75.000 g/mol) in der Verkapselungsmethode entsteht. Der hohe Kontrast ist auf Silikate zurückzuführen.

Sichtbare Aggregation konnte in Lösungen, die anorganische Salze enthielten oder in denen hochmolekulare Polyelektrolyte, z.B. PEI (MW ~ 75000 g/mol) (vgl. Abb. III 13), als Adsorbens verwendet wurden, nicht völlig verhindert werden. Unter den getesteten Polyaminverbindungen (Polyarginin, Polylysin und PEI) war PEI mit einem niederen mittleren Molekulargewicht in einem breiten Spektrum am Puffer-Zusammensetzungen und pH hinsichtlich des Problems der Aggregation das vielversprechendste Adsorbens.

Biosilicate haben typischer Weise die Morphologie verschmolzener sphärischer Silikatpartikel mit einem Durchmesser in der Größenordnung von 100 nm.^(80, 114) Um solche auf der Nanoskala wenig definierte Silikatstrukturen zu verhindern, wurde die biomimetische Mineralisation in einer Art und Weise gestaltet, die einen sehr kontrollierten Prozess unter annähernd physiologischen Bedingung verspricht. Die polyamindirigierte Biomineralisation wurde in einem Puffersystem durchgeführt, in dem es in der Abwesenheit von Polyaminen für eine vernünftige Zeitspanne (>1 d) nach Zugabe des Orthokieselsäurevorläufers Tetraethoxysilan (TEOS) zu keiner sichtbarer Aggregation oder Gelbildung kommt. Es wurden Puffersysteme gewählt, die niedermolekulare organische Aminverbindungen, wie Ethylamin, Morpholin und Ethanolamin, enthalten, welche die unmittelbar nach Hydrolyse des TEOS in Lösung gebildeten Polykieselsäuren oder Silikat-Nanopartikel stabilisieren und somit die untempleierte Aggregation der primären Silikatspezies verhindern.

In der typischen Prozedur wurde PEI (MW ~ 800 g/mol) aus 10 mM Ethylamin-Citrat-Puffer (pH 5) auf PM adsorbiert. Der Adsorptionsgrad des niedermolekularen PEI wurde spektroskopisch aus dem überschüssigen PEI in den Überständen der sich anschließenden Reinigungsschritte durch Zentrifugation bestimmt und betrug unter diesen Bedingungen 2% oder ~ 1.5 k monomere Einheiten pro BR. Nach Separation der durch Polymer bedeckten PM vom überschüssigen PEI wurde die Mineralisation durch Zugabe von TEOS in demselben Puffersystem gestartet. Das nach 1-12 Tagen erhaltene Rohprodukt wurde durch Zentrifugation im Dichtegradienten weiter aufgereinigt, gewaschen und bis zur weiteren Verwendung in gefriergetrocknetem Zustand gelagert.

Das erhaltene Material ist durch einen Massenzuwachs von 69% relativ zum eingesetzten PM und durch eine scharfe Bande im Dichtegradienten (Fig. Abb. III 14 A) charakterisiert, welche einer signifikant höheren Schwimmdichte ($\rho = 1.35$ g/mL) als der des unmodifizierten PM ($\rho = 1.18$ g/mL) ⁽¹¹⁵⁾ zuzuordnen ist. Der im verkapselten Material immer noch ausgeprägte Photochromismus (Fig. Abb. III 14 B) belegt, dass die

biologische Aktivität während der Präparation erhalten bleibt. Für diesen „optischen Funktionstest“ nach Verkapselung wurde PM, welches die BR-Variante BR-D96N enthält, eingesetzt, da die durch diese Punktmutation hervorgerufene Lebensdauerverlängerung des M^{II} -Intermediates (60) die Messung der Photochromie deutlich erleichtert. Die Photochromie reagiert sehr sensible auf strukturelle Veränderungen im BR oder in PM.

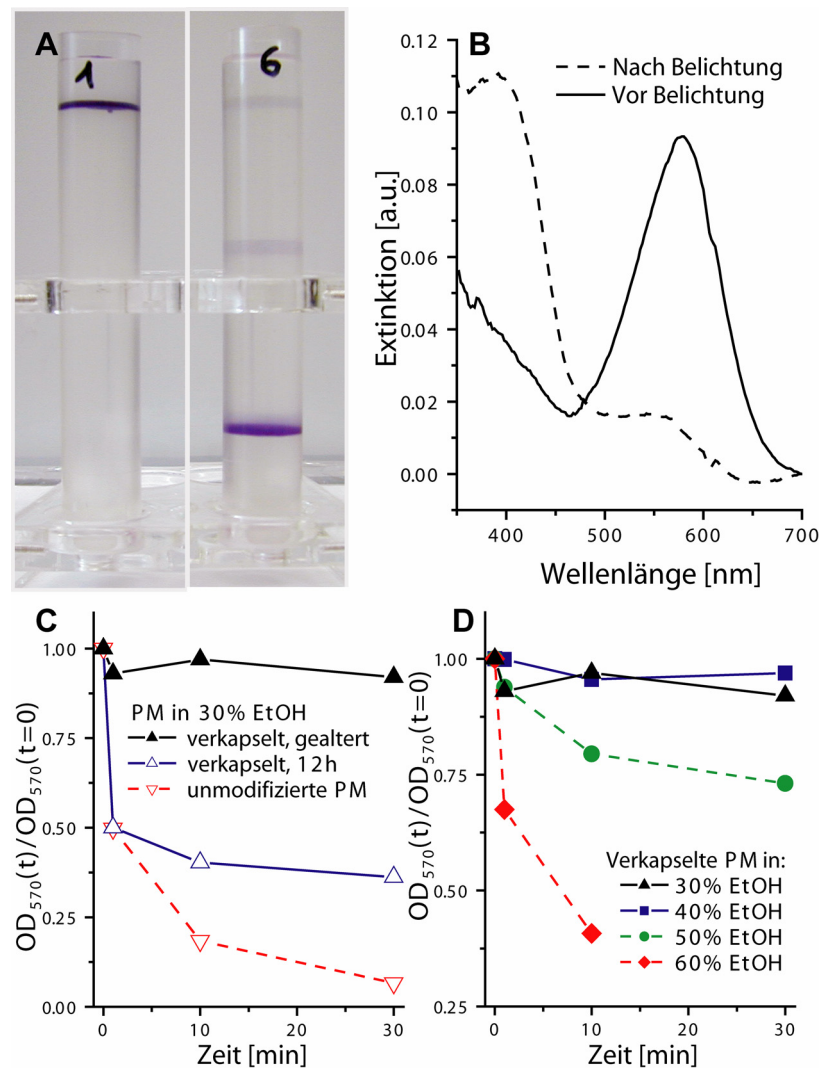


Abbildung III 14. Bulkeigenschaften der verkapselten PM. **(A)** Dichtegradienten nach Ultrazentrifugation beladen mit unmodifizierter PM (links) und verkapselter PM (rechts). Beide zeigen eine scharfe Bande (enge Schwimmdichtevertelung) bei unterschiedlichen Schwimmdichten (1.18 g/mL für die unbehandelte PM und 1.35 g/mL für das verkapselte Material). **(B)** Vor und kurz nach Belichtung des nanoverkapselten D96N aufgenommene Absorptionsspektren weisen eine ausgeprägten Photochromie auf, was darauf hinweist, dass die Funktion des ummantelten Biomaterials durch die Ummantelung nicht beeinträchtigt wird. **(C)** Auch wenn sich das verkapselte Material bereits nach einer Mineralisationszeit von 12 h in seiner Schwimmdichte kaum mehr verändert, so ist doch eine mehrtägige Alterung der Silikathülle notwendig, um effektiven Schutz vor denaturierenden Ethanol-Konzentrationen zu gewähren. Im Gegensatz zum gealterten Material, das bei 30% EtOH unveränderte Absorption zeigt, weist das jungen Materials eine deutliche Abnahme der zeitabhängigen normierten OD_{570} (Optische Dichte bei 570 nm) auf. **(D)** Die zeitabhängige Widerstandsfähigkeit gegenüber denaturierenden Ethanol-Konzentrationen wurde durch die Verkapselung stark erhöht. Während die native PM bereits bei 30% EtOH/H₂O nach kurzer Einwirkzeit einen deutlichen Abfall der normierten OD_{570} zeigt, bleibt das verkapselte Material bis zu Ethanolkonzentrationen von 50% EtOH/H₂O relativ stabil.

Die Graphen in Abb. III 14 C und 14 D zeigen die zeitabhängigen Veränderungen der optischen Dichte (OD) nach Einwirkung von Etanol. Während die Absorptionsbande bei 570 nm der nativen PM bereits bei 30% EtOH/H₂O schnell abnimmt (Abb. III 14 C), widersteht das verkapselte Material der schnellen Denaturierung durch Ethanol bis hin zu Konzentrationen von 50% EtOH/H₂O (Abb. III 14 D).

Die Mineralisation ist ein langsamer Prozess, der nach 12 h noch nicht abgeschlossen ist. (vgl. Abb. III 14 C) Erst nach Alterung der Silikathülle, die, wie noch gezeigt werden wird, vorwiegend an der äußeren Seite der Silikathaut stattfindet, wird die endgültige stabilisierende Wirkung durch die Verkapselung erreicht.

Das erhaltene Material besteht aus blattförmigen Partikeln, die in Form und Größe der zugrunde liegenden PM ähneln. Abbildung III 15 A zeigt die unkontrastierte TEM-Aufnahme eines typischen Partikels. Dieser Partikel enthält mindestens zwei überlappende PM-sheets. Solche Aufsichten der flachen Partikel können selbst in Filmen einer nominalen Dicke von 80 nm gefunden werden, wie sie durch ultramikrotomische Präparation erhalten werden. Der Querschnitt eines PM-sheets (Abb. III 15 B) zeigt, dass sich die Partikel aus unterschiedlich stark kontrastierenden dünnen Schichten (~5-7 nm) zusammensetzen. Die EDX-Analyse (Abb. III 15 C) belegt, dass der hohe Kontrast auf Silikate zurückzuführen ist.

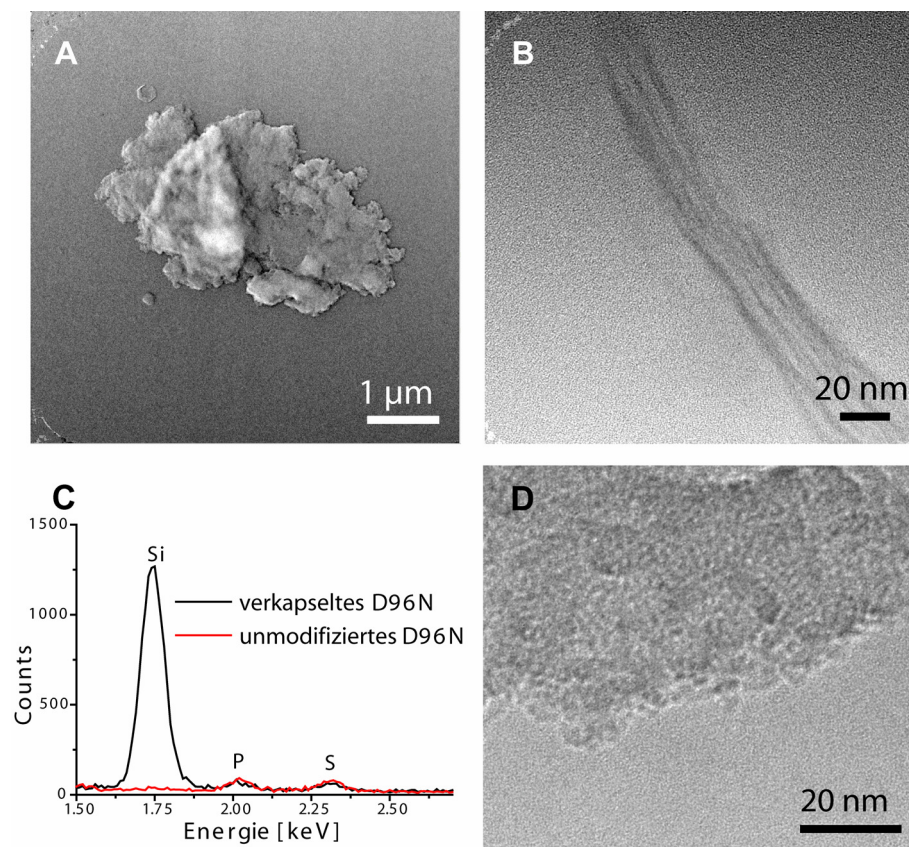
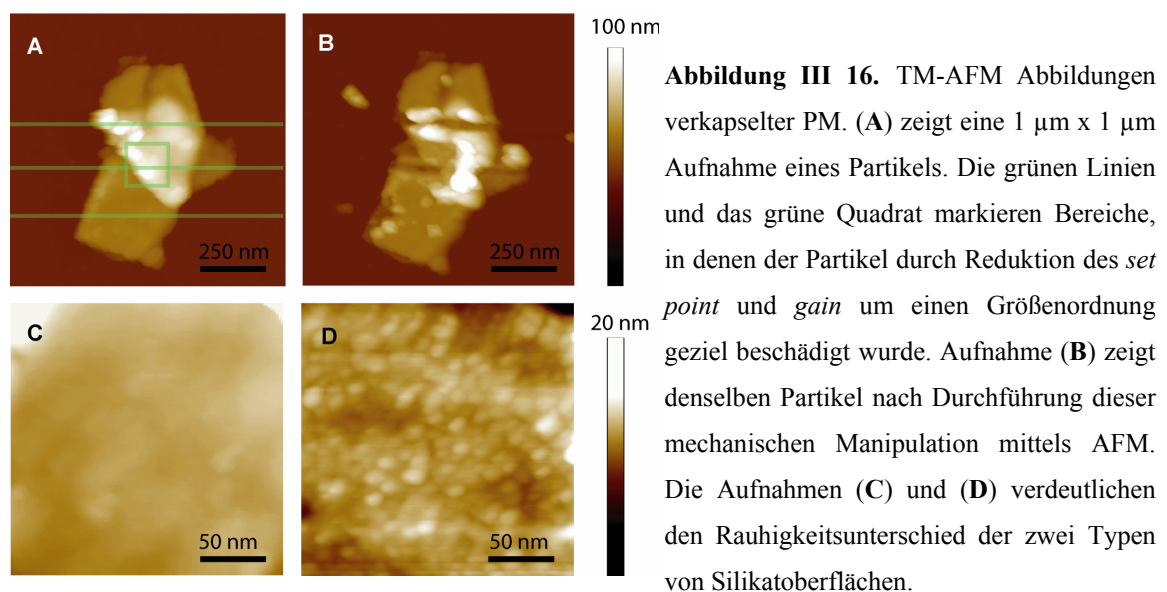


Abbildung III 15. Charakterisierung des Hybridmaterials mittels Elektronenmikroskopie. (A) zeigt die unkontrastierte TEM-Aufnahme der Aufsicht auf und (B) den Querschnitt durch einen typischen Partikel, wie er durch die vorgestellte Verkapselungsmethode erhalten. Der Querschnitt wurde durch Ultramikrotomie präpariert. (C) Das EDX-Spektrum des verkapselten Materials zeigt neben den Maxima, die den Elementen Phosphor und Schwefel zuzuordnen sind und auch in Referenzproben des nativen PM in ähnlicher Intensität auftreten, einen zusätzlichen ausgeprägten Siliziumpeak. Der Kontrast in den TEM-Aufnahmen ist auf Si zurückzuführen. Eine hoch auflösende TEM-Aufnahme, die die Nanostrukturierung der Silikathülle erkennen lässt ist in (D) dargestellt. Die Darstellung in (A) wurde so gewählt, dass helle Bereiche stark streuende Gebiete markieren. Für (B) und (D) gilt das Gegenteil.

Um die Schutzwirkung der Verkapselung vor kleinen, passiv diffundierenden Moleküle zu testen, wurde das verkapselte Material verschiedenen Konzentrationen an EtOH ausgesetzt. Bei fehlender oder durchlässiger Verkapselung führt dies bei EtOH/H₂O Konzentrationen über 30% schnell zur Störung der Integrität der PM und zum Funktionsverlust der PM. Bei intakter Verkapselung blieb die photochemische/biologische Funktion der eingeschlossenen PM bei EtOH Konzentrationen, die native PM in kurzer Zeit denaturieren, weitgehend erhalten. (Fig. III 14 C und 14 D) In Anbetracht der Dicke (~ 7 nm) und der körnigen Morphologie der Silikathülle (Fig. III 15 D) war diese zunächst überraschend.



Mit dem AFM steht ein komplementäres Werkzeug der Oberflächenanalyse zur Verfügung. Mit ihm lassen sich manche Oberflächeneigenschaften enthüllen, die bei transmissiven Methoden wie der TEM unentdeckt bleiben. Des Weiteren ermöglicht das AFM die gezielte mechanische Beschädigung der Partikel, was detaillierte Einblicke in die Topographie innerer, normalerweise nicht exponierter Schichten der Probe gewährt.

Das gezielte „Beschädigen“ des Partikels in Abb. III 16 A an den grün markierten Bereichen durch Reduktion des *set point* und *gain* um eine Größenordnung im *tapping mode* führt zur Freilegung innerer Schichten (Abb. III 16 B). Die Analyse von typischen Stufenhöhen in TM-AFM-Aufnahmen unbeschädigter Partikel und solcher, die mittels AFM mechanisch manipuliert wurden, erlauben die genaue Bestimmung der Dicke der unterschiedlichen Stufentypen und deren Zuordnung. Das Silikat-PEI-PM-PEI-Silikat-*sandwich* hat eine Dicke von 18.8 nm. Der in Abbildung III 14 A dargestellte Partikel

besitzt beispielsweise zwei dieser Stufen, die von zwei separaten, verkapselten PMs herrühren.

Zwei unterschiedliche Typen von Silikatoberflächen konnten identifiziert werden: eine glatte äußere ($R_{\text{RMS}} = 0.39 \text{ nm}$, Abb. III 16 C) und eine rauere innere Silikatoberfläche ($R_{\text{RMS}} = 0.76 \text{ nm}$, Abb. III 16 D). Die äußere Silikatoberfläche der Kapsel ist dabei deutlich glatter als die TEM-Aufnahmen (Fig. III 15 D) vermuten lassen. Die aus der Literatur bekannte Höhe von PM beträgt 5.2 nm .⁽¹¹⁶⁾ Die Dicke der Silikathülle variiert zwischen 6 nm und 7 nm . Abbildung III 17 verdeutlicht das durch TEM und AFM gewonnene Bild vom Aufbau dieser Partikel.

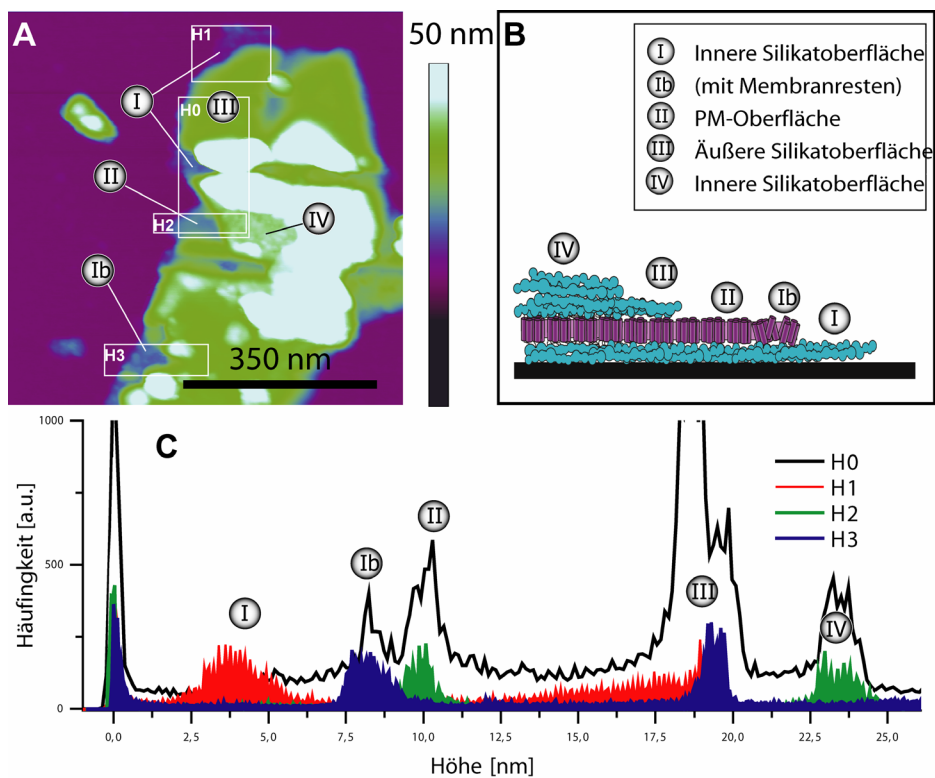


Abbildung III 17. (A) TM-AFM des gezielt beschädigten Partikels aus Abb. III 14 B. Die markierten Bereiche H0 bis H3 wurden für die Höhenstufenanalyse in (C) herangezogen. Die Markierungen in (A), (B) und (C) mit römischen Ziffern entsprechen den in Grafik (B) zugeordneten Oberflächen.

Das biologische Material ist von einem dünnen Polyelektrolyt-Kissen (< 1 nm) umgeben, das weich genug ist, um die für biologische Aktivität nötigen konformationellen Veränderungen zu erlauben. Obwohl die typischen Abstände zwischen den Lagen unterschiedlicher, hoch molekularer Polyelektrolyte in Polyelektrolytmultilayer im Bereich von ~ 10 nm liegen (74), ist das PEI eng mit den ungeordneten extramembranen Schleifen des BR verwoben und adsorbiert im Wesentlichen als flache zweidimensionale Lage auf der Lipidbilage.(113) Adsorbierte dünne PEI Filme unter einer Dicke von 1 nm sind generell nicht auf PM-Substrate limitiert, vielmehr scheint dies eine allgemeine Eigenschaft der Wechselwirkung zwischen PEI und Lipidbilagen zu sein.(117)

Die biomimetisch gebildete Silikathaut besteht anfänglich aus kleinen initialen Silikatpartikel mit einer Größe von 3-7 nm im Durchmesser. Alterung führt zu einer Glättung und Versiegelung der äußeren Oberfläche der Silikathülle. Dies kann durch Oswald Reifung erklärt werden, wie man sie von anderen Partikel kennt. Auf der inneren Oberfläche der Silikathülle, die im direkten Kontakt mit der PEI- bzw. Lipidbilage steht, treten nur sehr kleine Veränderungen in der Morphologie auf.

Dieses Bild vom oberflächendirigierten Mineralisationsmechanismus wird neben der Untersuchungen mittels TEM und AFM durch die Tatsache getragen, dass Material, welches zwar schon den endgültigen Massenzuwachs aufweist, jedoch erst 12 h gealtert ist, wesentlich empfindlicher auf EtOH reagiert (Abb. III 14 C). Des Weiteren erscheinen Proben, die nach 12 h der Reaktion während des Mineralisationsschritts entnommen wurden, weniger homogen durch Silikat bedeckt als die gealterten Proben, wie TEM-Aufnahmen zeigen. (Abb. III 18 A und B) Auch weisen solche Proben (Abb. III 18 D) im Vergleich mit gealterten Proben (Abb. III 18 C) weniger scharfe Banden und eine breitere Schwimmdichtevertelung im Dichtegradienten auf.

Der Einfluss der Hydrolysegeschwindigkeit des Orthokieselsäurevorläufers hat nur innerhalb der ersten Stunden Einfluss auf die Durchlässigkeit der Silikathülle gegenüber EtOH. (Abb. III 18 C) Tetramethoxysilan (TMOS) hydrolisiert unter annähernd physiologischen Bedingungen schneller als Tetraethoxysilan (TEOS). Der Austausch von TEOS gegen TMOS in der Verkapselungspräparation führt zu einer höheren Stabilität nach einer Mineralisationszeit von 12 h. (Abb. 18 C) Nach 3 Tagen weisen die Proben auch bei höheren EtOH-Konzentrationen noch eine ausgeprägte Photochromie auf; in

ihrer EtOH-Stabilität gibt es keinen Unterschied zwischen den mit unterschiedlichen Orthokieselsäurevorläufern präparierten Proben.

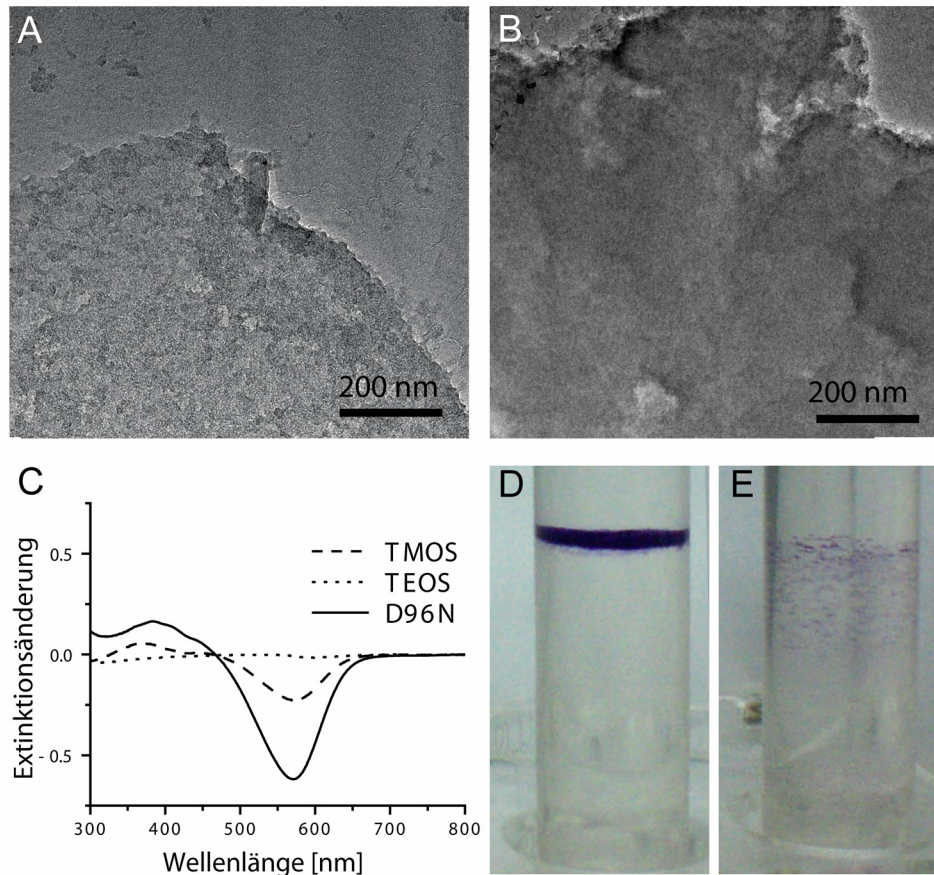


Abbildung III 18. Nach einer Reaktionszeit im Mineralisationsschritt von nur 12 h erscheint die Partikeloberfläche im TEM weniger homogen durch Silikat bedeckt (**A**) zu sein als die von Partikeln, die für 12 Tage gealtert sind (**B**). Das Differenzspektrum vor und 10 min nach Inkubation in 30% EtOH zeigt, dass der Austausch von TEOS durch TMOS zu einer erhöhten Stabilität nach 12 h führt. (**D**) und (**E**) zeigen Banden im Dichtegradienten von unmodifiziertem D96N (**D**) und einer Probe von für 12 h verkapseltem PM, die gemäß dem Standardprotokolls, jedoch bei pH 7 und in 50 nM Puffer, dargestellt wurde.

Die einheitliche Schwimmdichte des gealterten Hybridmaterials ermutigt, dass TEM- und AFM-Aufnahmen, obwohl sie in einer Weise durchgeführt wurden, die keine statistischen Aussagen zulässt, ein repräsentatives Bild liefern.

3.2.2 Verwendung der verkapselten PM als photochromes Farbpigment

In Zusammenarbeit mit Martin Neebe (AG Hampp) konnte im Rahmen des Teilprojekts B-Safe (FKZ: 13N8196, Teil des Verbundprojekts: „Multifunktionale optische Sicherungssysteme auf der Basis von Bakteriorhodopsin“) erstmals die Anwendung von Bakteriorhodopsin-Pigment im Offset-Druck erfolgreich demonstriert werden:

Dabei wurden Siliziumdioxid-verkapselte PM-Pigmente, die nach der im vorangegangenen Kapitel beschriebenen Nanoverkapselungsmethode hergestellt wurden, eingesetzt. Diese Pigmente sind photochrom und weisen eine deutlich verbesserte Stabilität gegenüber Lösungsmittelinwirkung auf, beides für die erfolgreiche Prozessierung im Offset-Druck als Sicherheitspigment eine essentielle Voraussetzung ist.

Kommerzieller Drucklack wurde mit bis zu 30% verkapselter Purpurmembran pigmentiert. Die erhaltene Druckfarbe erweist sich als lagerstabil und druckbar (getestet mit Feuchtmittel auf Bogenoffset-Maschine Rotaprint bei 3000-7000 Bogen/h, bei einer Auflage von <104 Bogen). Die Druckmuster sind photochrom. Aufgrund der im Offset erzielbaren geringen Nassschichtdicken wird ein visuell wahrnehmbarer Farbwechsel erst im Mehrfachdruck erzielt. Bei mindestens zweischichtigem Druckauftrag werden photochrome Muster erhalten, die für die maschinelle Photochromie-Detektion geeignet sind.

3.2.3 Biomimetische Nanoverkapselung anderer Modell-Oberflächen

Die an der Modellschubstanz PM entwickelte Verkapselungsmethode basiert auf der Adsorption einer die Silikatmineralisation dirigierenden Polyethylenaminlage (PEI) und sollte prinzipiell auf alle negativ geladenen Oberflächen übertragen sein, auf denen sich die Adsorption der Polyelektrolytlage unter Bedingungen durchführen lässt, die auch für die Silikatmineralisation geeignet sind.

Im Folgenden wird die breite Anwendbarkeit dieser Verkapselungsmethode exemplarisch anhand zweier Modell-Oberflächen/Substanzen demonstriert, nämlich kommerziell erhältliche, karbonsäure-funktionalisierte Latexpartikel mit einem Durchmesser etwa 400 nm und *single wall carbon nanotubes* (SWNT).

Um die SWNT der Modifikation durch Polyelektrolytadsorption zugänglich zu machen, wurden diese gemäß Liu (91) partiell zu ihren Carbonsäuren oxidiert. Dies verbessert ihre Dispergierbarkeit in wässrigen Medien deutlich.

Die Adsorption von PEI aus wässrigem Medium auf den modifizierten SWNT führte zur Bildung von schnell sedimentierenden, sichtbaren Aggregaten, die sich auch im Ultraschallbad nur teilweise redispergieren ließen. Das Problem der Aggregation in Gegenwart von PEI konnte auch durch Variation des pH-Wertes (pH 3-8) und der Ionenstärke des Puffers (10 mM bis 500 mM) sowie Verwendung unterschiedlich langkettiger PEI (MW ~ 800 g/mol bis 700 kg/mol) nicht befriedigend gelöst werden.

So konnten auch nach oberflächentemplierter Silikatmineralisation in TEM-Aufnahmen (Abb. III 19) keine isolierten, verkapselten SWNT gefunden werden. Das aus etwas 15 nm dicken Zylindern aufgebaute Kompositmaterial weist im TEM eine definierte *core-shell*-Morphologie auf. (Abb. III 19) Dabei entfallen ca. 2 x 5 nm der Dicke auf die Silikathülle und 5 - 6.5 nm auf die PEI-ummantelten, modifizierten SWNT.

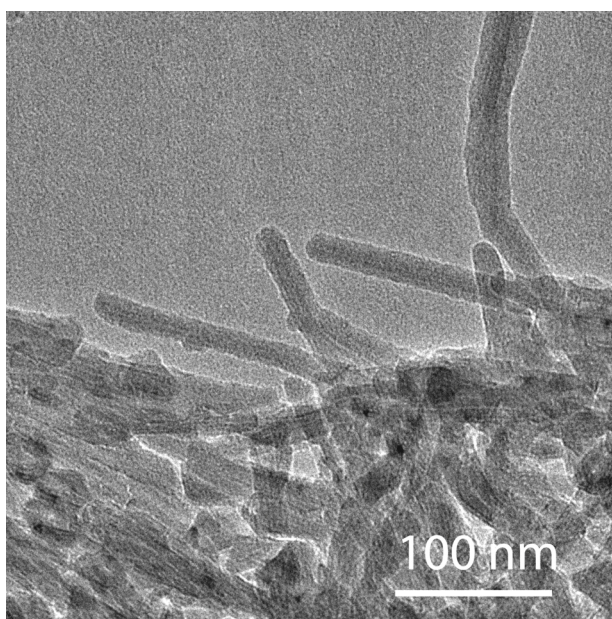


Abbildung III 19. TEM-Aufnahme von verkapselten SWNT. Eine definierte *core-shell*-Morphologie des Materials ist zu erkennen.

Das Problem der Aggregation bei Zugabe von PEI konnte bei Anwendung der Verkapselungsmethode auf die mikroskopischen Latexpartikel durch geeignete Pufferzusammensetzung weitgehend eliminiert werden. Auch lassen sich diese im Ultraschallbad wesentlich einfacher Homogenisieren, da im Vergleich zu den nanoskopischen SWNT die im Ultraschallbad wirksamen Scherkräfte viel größer sind.

Bei den Verkapselung der Latexpartikel zeigte es sich, dass sich durch Anhebung der zugefügten Menge des Kieselsäurevorläufers TMOS in gewissem Umfang die Dicke der

Silikathaut (vgl. Abb. III 20, unten) und damit die Schwimmdichte (Abb. III 20, oben) erhöhen lässt. Bei Verwendung von 50 μL TMOS und mehr erhält man allerdings keine isolierten Partikel, sondern makroskopische Agglomerate von undefinierter Zusammensetzung.

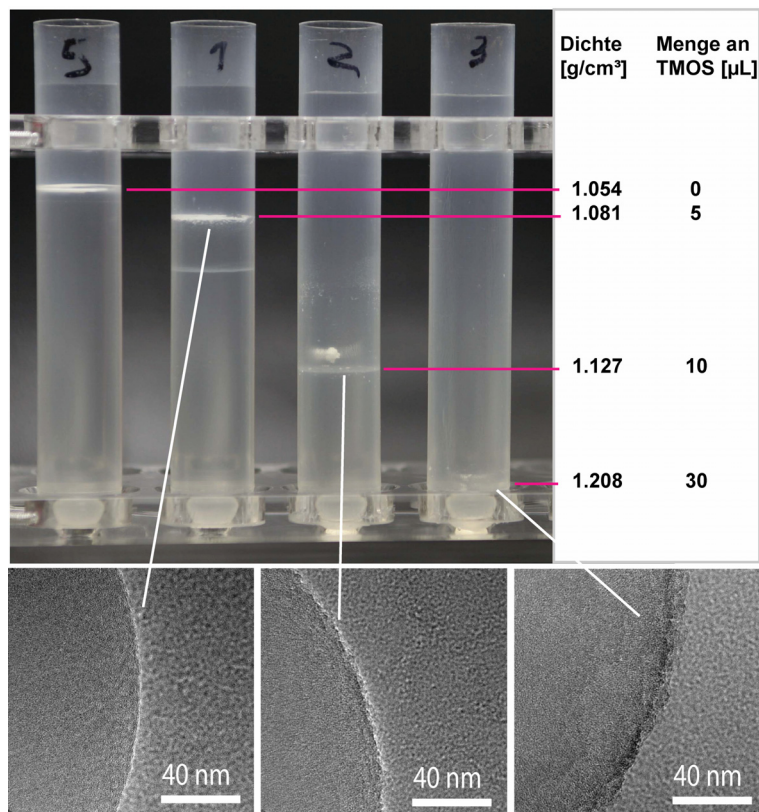


Abbildung III 20. Ergebnisse der Dichtezentrifugation (**oben**) und TEM-Aufnahme (**unten**) von mit verschiedenen Mengen des Kieselsäurevorläufers, TMOS, verkapselter Latexpartikel. Die Präparation erfolgte nach dem Standardprotokoll wobei lediglich die Menge an zugesetztem TMOS (**rechts**) verändert wurde.

Die Dicke der Silikatschicht auf den Latexpartikeln lässt sich im TEM (vgl. Abb. III 20, unten) wegen Aufladungseffekten und unförmiger Gestalt dieser Lagen nicht exakt bestimmen. Die Schichtdicke liegt einer vorsichtigen Abschätzung zu Folge je nach Menge des zugesetzten TMOS zwischen 2 nm und 15 nm.

Wie nicht anders zu erwarten, verlief der Nachweis von Silizium mittels EDX für beide Modellsubstanzen nach Verkapselung positiv. Kontrollexperimente (EDX, TEM, Schwimmdichte) verifizierten die Anlagerung einer Silikatschicht an die Modelloberflächen.

Die Porosität der nicht gealterten Proben (12 h) erlaubt das Herauslösen des Latex aus seiner Silikathülle mit THF. Die Alterung wurde dabei in einfacher Weise durch Entzug des wässrigen Mediums abgebrochen. In Abbildung III 21 sind TEM-Aufnahmen verkapselter Latexpartikel vor (A) und nach (B) Einwirken von THF abgebildet. Im Gegensatz zu den dickwandigeren Ummantelungen, die durch Adsorption und Versinterung von mesoskopischen Partikeln auf Latexpartikel erhalten werden,⁽¹¹⁸⁾ ist die Silikathaut dieser Methode so dünnwandig, dass sie beim Trocknen der Proben kollabiert.

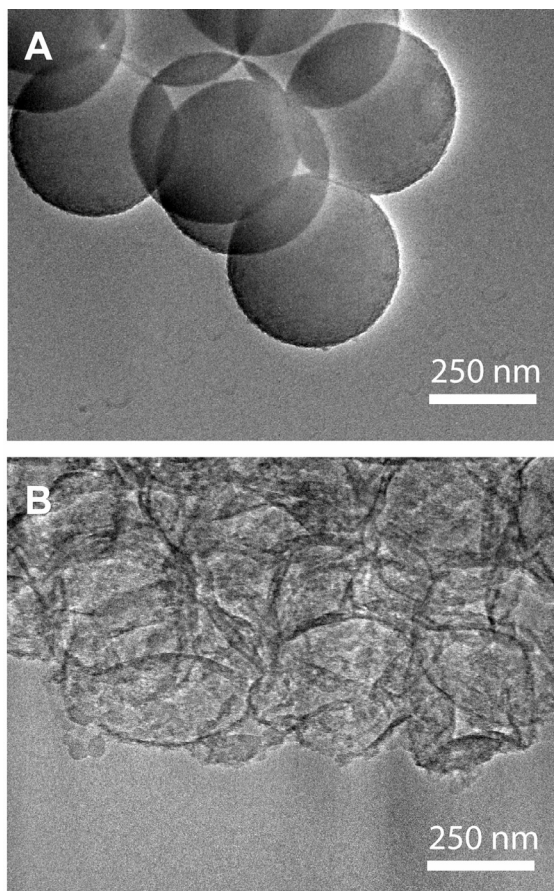


Abbildung III 21. TEM-Aufnahmen verkapselter Latexpartikel vor (A) und nach (B) Einwirken von THF.

Im Allgemeinen ist die Handhabung dieser beiden Modellsubstanzen wesentlich unkomplizierter als die von PM, bei deren Verarbeitung man beispielsweise ohne die meisten organische Lösungsmittel oder Ultraschallbehandlung auskommen muss, wenn man die mechanische Zerkleinerung der PM in kleinere Membranfragmente (<250 nm Durchmesser ⁽¹¹⁹⁾ bzw. Denaturierung durch Lösungsmittel vermeiden möchte. Während die Latexverkapselung den Prototyp für die Verkapselung großer Oberflächen bzw. für die Oberflächenversiegelung darstellt, sind die Experimente mit SWNT ein Beleg dafür, dass sich diese Methode durchaus auf Oberflächen mit kleinen Krümmungsradien anwenden lässt.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Fasst man die Ergebnisse dieser Arbeit zusammen, so wird deutlich, dass die wesentlichen Probleme, mit denen man sich bei der Integration biologischer Bausteine in technische Anwendungen konfrontiert sieht, anhand zweier interessanter Modellsysteme gelöst wurden. Die Schwierigkeiten bei der Verarbeitung dieser Substanzklasse sind ein Resultat ihrer im Allgemeinen geringen Stabilität und den mangelhaften bzw. nicht vorhandenen strukturgebenden Assemblierungs-Verfahren für biologische Bausteine.

Konkrete, für den technisch Maßstab relevante Lösungsansätze hierfür wurden anhand der biologischen Modellsubstanzen, MrgA und Purpurmembran, erarbeitet und werden im Folgenden vorgestellt.

4.1 Oberflächenstrukturierung durch Proteinadsorption

Anhand des dodekameren Eisenspeicherproteins MrgA wurde eine Methode zur Nanostrukturierung von Oberflächen durch Adsorption von Biomolekülen entwickelt, die sich zur großflächigen Strukturierung eignet und als *bottom-up*-Assemblierungsschritt in etablierte Oberflächenstrukturierungsverfahren integrierbar ist.

Zunächst wurden trockene Adsorptionsschichten von MrgA auf verschiedenen Substraten aus wässrigen Lösungen hergestellt und Trends bezüglich Oberflächenbedeckung und Morphologie mittels AFM untersucht. Auf hydrophilen Substraten konnten dabei kristalline Monolagen von MrgA erhalten werden. Sowohl die Morphologie und als auch die Oberflächenbedeckung hängen dabei stark von den Inkubationsbedingungen, den Oberflächeneigenschaften des Substrats und der Art der Durchführung von Wasch- und Trockenschritten ab. Während bei der Adsorption elektrostatische Wechselwirkungen dominant die Oberflächenbedeckung bestimmen und ein Maximum unter Bedingungen gefunden wurde, bei denen sich Protein- und Substratladung in etwa kompensieren, ist die Mobilität des adsorbierten MrgA auf dem Substrat wichtig für die Ausbildung großer kristalliner Domänen.

Obwohl derzeit zwar hochauflösende Aufnahmen von Proteinmonolagen im feuchten und trockenen Zustand möglich sind, entziehen sich die Veränderungen während des Trocknens der direkten Beobachtung. Experimente dieser Arbeit belegen jedoch, dass die beim Trocknen der Probe wirkenden Kapillarkräfte einen entscheidenden morphogenetischen Einfluss haben. Auch durch Ändern der Zusammensetzung der einwirkenden

Lösung auf das Substrat kann die Morphologie einer bereits adsorbierten Proteinmonolage unabhängig vom Belegungsgrad verändert werden. Bei ausreichend lateraler Mobilität ist beispielsweise durch Mg^{2+} -Ionen eine Kristallisation innerhalb einer bereits adsorbierten MrgA-Monolage unter Bedingungen, bei denen keine Desorption stattfindet, induzierbar. Sowohl die Kapillarkräfte als auch das „Aussalzen in zwei Dimensionen“ lassen sich als nachträgliche Manipulationen einer Proteinadsorptionslage zur gezielten Gestaltung der Oberflächenmorphologie ausnutzen.

Die Erfahrungen bei der Proteinadsorption auf den unstrukturierten Substraten bildeten die Grundlage für die Entwicklung einer Methode zur gerichteten Selbstassemblierung von MrgA auf in ihrer Affinität zum MrgA strukturierten Substraten. Diese wurden durch Mikrokontaktdruck von unterschiedlich funktionalisierten Alkanthiolen hergestellt. Dank der genau abstimmbaren Affinität und unter Ausnutzung eines im Mikrokontaktdruck eher unerwünschten Artefakts, des randidomanten Tintentransfers, waren durch oberflächentemplierte Selbstassemblierungen Strukturen von MrgA-Monolagen in der Größenordnung weniger 10 nm zugänglich.

Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die Proteinhülle im Niederdruckplasma restlos entfernen lässt und dabei die Metalloxid-Nanopartikel (Ferrihydrit) im Inneren des Proteins an der durch die Proteinmonolage festgelegten Position verbleiben. Damit erfüllt MrgA alle Bedingungen, die man an ein nützliches Werkzeug für die Handhabung von Nanopartikel stellt.

4.2 Nanoverkapselung biologischer Bausteine

Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Verkapselungsmethode kombiniert in innovativer Weise das Konzept der *layer-by-layer*-Assemblierung von Polyelektrolyten mit der oberflächentemplierten Silikatmineralisation durch Polyamine. Die wesentlichen Arbeitsschritte sind dabei die Modifikation der Zieloberfläche durch Adsorption einer Polyaminlage gefolgt von der spezifischen, durch die präparierte Oberfläche katalysierten Polykondensation von Kieselsäuren.

Durch Optimierung verschiedener Prozessparameter anhand der Modellschubstanz Purpurnembran konnte dieser Ansatz zu einem Verfahren weiter entwickelt werden, das zum Einen Nanopartikel des Hybridmaterials von definierter Zusammensetzung erzeugt und zum Anderen für biologische Bausteine geeignet ist, d.h. die biologische Funktion bleibt dabei erhalten und wird durch die Verkapselung sogar geschützt. Diese Methode

ist auf technisch relevante Substanzmengen anwendbar und konzeptionell für eine Vielzahl unterschiedlicher auch nicht-biologischer Substanzen wie beispielsweise Latexpartikel und *single wall carbon nanotubes* geeignet.

Detaillierte Untersuchungen der erhaltenen Partikel des Hybridmaterials mit komplementären, hochauflösenden Methoden (TEM und AFM) bestätigten einen auf der Nanoskala definierten, mit den Arbeitsschritten konsistenten Aufbau: Das biologische Material ist von einer wenige nm dünnen Silikathaut verkapselnd eingeschlossen, die sich ohne Verlust der guten Dispergierbarkeit der Partikel im Bereich zwischen 2 nm und 15 nm einstellen lässt.

Die zunächst poröse, dünnwandige Silikatverkapselung, die in TEM-Aufnahmen eine körnige Morphologie aufweist, minimiert in einer zur Oswald-Reifung analogen, langsamen Alterung des Materials ihre Oberfläche. Wie eine detaillierte Oberflächenanalyse mittels AFM an freigelegten Lagen des Hybridmaterials ergab, vollzieht sich diese Glättung dabei vornehmlich an der äußeren Oberfläche der Silikatummantelung.

Durch Entzug des Lösungsmittels kann dies jederzeit unterbrochen und somit die Porosität der Verkapselung eingestellt werden. Denaturierungsexperimente mit verkapselter PM belegen eine steigende Lösungsmittelresistenz mit fortschreitender Alterung. Die durch eine 7 nm starke Silikathaut ummantelte Purpurmembraan erlangt nach Alterung eine erstaunliche Lösungsmittelresistenz, die den Einsatz dieses Hybridmaterials in ansonsten denaturierenden Bedingungen erlaubt. Aber auch für die Herauslösbarkeit des Latex aus in analoger Weise hergestellten Latexpartikelverkapselungen ist der Fortschritt der Alterung eine kritische Größe.

4.3 Allgemeiner Ausblick

Die vorgestellten Methoden wurden im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch für die beiden Modellsubstanzen MrgA und Purpurmembraan bis zu einem Punkt entwickelt, an dem der Nutzen für technische Anwendungen der mit ihnen prozessierten biologischen Bausteine deutlich wird.

Im Fall von MrgA ist dies die Strukturierung von Oberflächen durch Nanopartikel-Lagen definierter Morphologie. Derartige hexagonale Anordnungen von Nanopartikel aus ferritinanalogen Proteinen sind nicht nur für die Fertigung elektronischer Bauteile, wie nanopartikel-basierende MOSFETs (22), bedeutend, auch andere Anwendungen, die Eigenschaften, z.B. ihre magnetischen (120, 121) oder katalytischen (122), der durch

diese Proteinklasse in verschiedenen Größen monodispers darstellbaren Nanopartikel nutzen, sind denkbar.

Die anhand von MrgA gewonnenen Erkenntnisse für die Proteinadsorption im Allgemeinen sind sicherlich in anderen Bereichen wie der Strukturaufklärung mittels Elektronen-Kristallographie (21) hilfreich, zumal systematische Untersuchungen solcher Lagen in der Literatur kaum vertreten sind.

Die Einbeziehung kapillarer Kräfte als ordnendes Prinzip in Proteinmonolagen und im speziellen auf strukturierten Oberflächen hat hohes Potential für die Darstellung 2D-kristalliner Monolagen. Gegenwärtig ist die direkte Beobachtung der Vorgänge auf solchen Oberflächen unter Bedingungen, bei denen Kapillarkräfte wirksam sind, nicht möglich. Um dies im vollen Umfang für die Darstellung strukturierter Oberflächen nutzbar zu machen, scheint die Entwicklung geeigneter Analysemethoden lohnenswert.

Während die gerichtete Adsorption und Selbstassemblierung die Domäne kleiner bis etwa 100 nm großer Bausteine ist und spezifische Wechselwirkungen nutzt,(1, 2) unterliegt die anhand der Verkapselung von PM entwickelten Methode kaum Einschränkungen bezüglich der Größe und Beschaffenheit der dadurch prozessierbaren Oberflächen: Im Grunde sollten dadurch alle Oberflächen modifizierbar sein, die auch der *layer-by-layer*-Assemblierung von Polyelektrolyten zugänglich sind. Diese reichen von makroskopischen Oberflächen bis hin zu einzelnen Biomolekülen wie DNA.(76)

Die Anwendung dieser Methode auf PM erlaubt ihren Einsatz in ansonsten denaturierenden Bedingungen. Sowohl dünnwandige Verkapselung, die das Licht wenig streut, als auch die stark verbesserte Stabilität gegenüber organischen Lösungsmitteln waren notwendige Voraussetzungen, um PM erstmals als photochromes Pigment erfolgreich im Offsetdruck prozessieren zu können. Dies gilt freilich auch für andere optische Anwendungen von Purpurmbran, z.B. zur Datenspeicherung (57).

Die Methode ist auf relevante Substanzmengen skalierbar (im Labor konnten mehrer Gramm Purpurmbran damit umgesetzt werden) und liefert dabei ein auf der Nanoskala definiertes Hybridmaterial. Die Anpassung dieser Methode auf andere Materialien gestaltet sich unproblematisch. Die Anwendungsmöglichkeiten zur Stabilisierung empfindlicher biologischer Bausteine scheint unbegrenzt: Biosensoren,(123) Enzyme für die Synthese (61-63, 71) und therapeutische Peptide bis

hin zu ganzen Zellen in der Medizin (67-70) sind alles Beispiele, wo diese Methode gewinnbringend eingesetzt werden könnte. (vgl. Abb. IV 1)

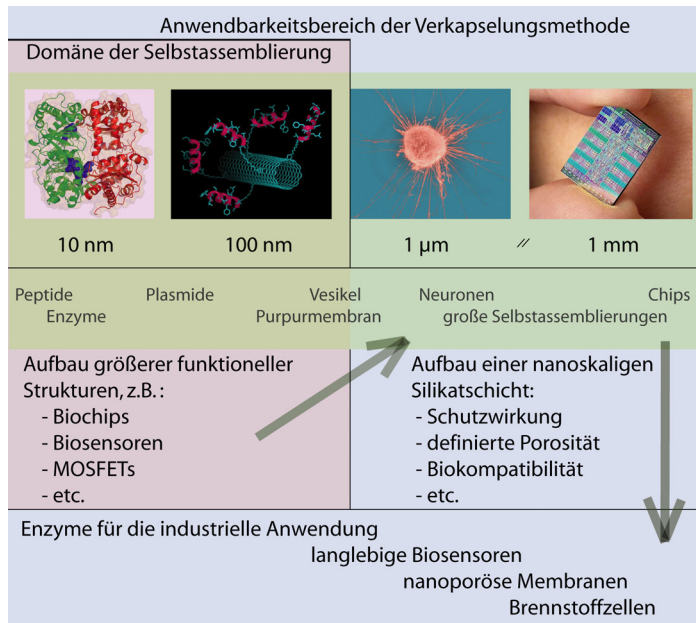


Abbildung IV 1. (124-127) Domäne der Selbstassemblierung und Anwendungsbereich der Verkapselungsmethode. Diese Abbildung veranschaulicht potentielle Anwendungen der in dieser Arbeit entwickelten Methoden.

Aber auch außerhalb der Zielsetzung dieser Arbeit sind hauchdünne Silikatschichten, die dabei eine hohe Diffusionsbarriere für kleine organische Moleküle darstellen interessant. Solche Protonenleiter könnten z.B. als Beschichtung von Membranen in *direct methanol fuel cell* (DMFC) Verwendung finden.(128)

Einstellung und Fixierung definierter Porengrößen sowie anschließende Oberflächenmodifikationen der Silikathülle sind an diese Arbeit anknüpfende Problemstellungen.

5. Literaturverzeichnis

- (1) D. Pum, A. Neubauer, E. Györfvay, M. Sara, U. B. Sleytr *Nanotechnology* **2000**, *11*, 100.
- (2) K. Keren, R. S. Berman, E. Buchstab, U. Sivan, E. Braun *Science* **2003**, *302*, 1380.
- (3) L. Chen, L. Keramati, J. D. Helmann *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1995**, *92*, 8190.
- (4) D. Oesterhelt, W. Stoeckenius *Nature (London) New Biol.* **1971**, *233*, 149.
- (5) L. Chen, J. D. Helmann *Mol. Microbiol.* **1995**, *18*, 295.
- (6) M. M. O. Pana, G. S. Bullerjahn *J. Biol. Chem.* **1995**, *270*, 22478.
- (7) R. A. Grant, D. Filman, S. E. Finkel, R. Kolter, J. M. Hogle *Nature Struct. Biol.* **1998**, *5*, 294.
- (8) A. Nicholls, *GRASP: Graphical representation and analysis of surface properties*, (Columbia University, NY, **1992**).
- (9) S. Nair, S. E. Finkel *J. Bacteriol.* **2004**, *186*, 4192.
- (10) A. Martinez, R. Kolter *J. Bacteriol.* **1997**, *179*, 5188.
- (11) A. Sen, K. Dwivedi, K. A. Rice, G. S. Bullerjahn *Arch. Microbiol.* **2000**, *173*, 352.
- (12) N. D. Chasteen, P. M. Harrison *J. Struct. Biol.* **1999**, *126*, 182.
- (13) G. Zhao, P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T. M. Laue, E. Chiancone, N. D. Chasteen *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 27689.
- (14) F. Buda, B. Ensing, M. C. Gribnau, E. J. Baerends *Chemistry* **2003**, *9*, 3436.
- (15) A. Minsky, E. Shimoni, D. Frenkiel-Krispin *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2002**, *3*, 50.
- (16) D. Frenkiel-Krispin, S. Levin-Zaidman, E. Shimoni, S. G. Wolf, E. J. Wachtel, T. Arad, S. E. Finkel, R. Kolter, A. Minsky *EMBO J.* **2001**, *20*, 1184.
- (17) M. Bozzi, G. Mignogna, S. Stefanini, D. Barra, C. Longhi, P. Valenti, E. Chiancone *J. Biol. Chem.* **1997**, *272*, 3259.
- (18) E. Papinutto, W. G. Dundon, N. Pitulis, R. Battistutta, C. Montecucco, G. Canotti *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 15093.

- (19) G. Canotti, E. Papinutto, W. G. Dundon, R. Battistutta, M. Seveso, G. Del Giudice, R. Rappuoli, C. Montecucco *J. Mol. Biol.* **2002**, 323, 125.
- (20) P. Ceci, S. Cellai, E. Falvo, C. Rivetti, G. L. Rossi, E. Chiancone *Nucl. Acids Res.* **2004**, 32, 5935.
- (21) H. Haas, G. Brezesinski, H. Möhwald *Biophys. J.* **1995**, 68, 312.
- (22) T. Matsui, N. Matsukawa, K. Iwahori, K. Sano, K. Shiba, I. Yamashita *Langmuir* **2007**, 23, 1615.
- (23) H. Yoshimura, T. Scheybani, W. Baumeister, K. Nagayama *Langmuir* **1994**, 10, 3290.
- (24) A. P. Minton *Biophys. Chem.* **2000**, 86, 239.
- (25) J. J. Gray, R. T. Bonnecaze *J. Chem. Phys.* **2001**, 114, 1366.
- (26) J. J. Gray *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2004**, 14, 110.
- (27) P. A. Kralchevsky, N. D. Denkov *Curr. Opin. Col. Interface Sci.* **2001**, 6, 383.
- (28) P. E. Sheehan, L. J. Whitman *Phys. Chem. Lett.* **2002**, 88, 1561041.
- (29) N. D. Denkov, O. D. Velev, P. A. Kralchevsky, I. B. Ivanov *Nature* **1993**, 361, 26.
- (30) P. A. Kralchevsky, V. N. Paunov, I. B. Ivanov, K. Nagayama *J. Coll. Interface Sci.* **1992**, 151, 79.
- (31) E. Lifshitz, I. Dag, I. Litvin, G. Hodes, S. Gorer, R. Reisfeld, M. Zelner, H. Minti *Chem. Phys. Lett.* **1998**, 288, 188.
- (32) S. Günter, *Nanoparticles, From Theory to Application* (Wiley-VCH, Weinheim, **2004**)
- (33) E. Katz, I. Willner *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, 43, 6042.
- (34) B. O'Regan, M. Grätzel *Nature* **1991**, 353, 737.
- (35) S. Mann *Nature* **1993**, 365, 499.
- (36) T. Douglas, M. Young *Nature* **1998**, 393, 152.
- (37) M. Okuda *et al. Nano Lett.* **2005**, 5, 991.
- (38) K. Iwahori *et al. Inorg. Chem.* **2005**, 44, 6393.

- (39) R. Tsukamoto *et al.* *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2005**, 78, 2075.
- (40) Diplomarbeit von Anke Morbitzer, *Kristallstruktur des dodecameren Ferritins MrgA aus Bacillus subtilis: Eine Ausgangsbasis für die Konstruktion hochsymmetrischer Fusionsproteine* (Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg, **2002**)
- (41) K. Sano, K. Ajima, K. Iwahori, M. Yudusaka, S. Iijima, O. Yamashita, K. Shiba *Small* **2005**, 10, 3290.
- (42) A. Tinazli, J. Tang, R. Valiokas, S. Picuric, S. Lata, J. Piehler, B. Liedberg, R. Tampé *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 5249.
- (43) L. Strong, G. M. Whitesides *Langmuir* **1988**, 4, 546.
- (44) C. D. Bain, G. M. Whitesides *Science* **1988**, 240, 62.
- (45) G. Y. Liu, N. A. Amro *PNAS* **2002**, 99, 5165.
- (46) I. Koltover, J. Raedler, T. Salditt, K. Rothschild, C. Safinya *Phys. Rev. Lett.* **1999**, 82, 3184.
- (47) R. Henderson, J. Baldwin, T. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. Downing *J. Mol. Biol.* **1990**, 213, 899.
- (48) D. Oesterhelt, W. Stoeckenius *Methods Enzymol.* **1974**, 31, 667.
- (49) Y. Shen, C. Safinya, K. Liang, A. Ruppert, K. Rothschild *Nature* **1993**, 366, 94.
- (50) R. Henderson, P. N. Unwin *Nature* **1975**, 257, 28.
- (51) D. J. Müller, F. A. Schabert, G. Büldt, A. Engel *Biophys. J.* **1995**, 68, 1681.
- (52) O. Kandler *Naturwissenschaften* **1981**, 68, 183.
- (53) R. Neutze, E. Pebay-Peyroula, K. Edman, A. Royant, J. Navarron, E. Landau *Biochim. Biophys. Acta* **2002**, 1565, 144.
- (54) S. Subramaniam, M. Lindahl, P. Bullough, A. Faruki, J. Tittor, D. Oesterhelt, L. Brown, J. Lanyi, R. Henderson *J. Mol. Biol.* **1999**, 287, 145.
- (55) J. K. Lanyi *J. Phys. Chem. B* **2000**, 104, 11441.
- (56) A.-N. Bondar, M. Elstner, S. Suhai, J. C. Smith, S. Fischer *Structure* **2004**, 12, 1281.

- (57) N. Hampp *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1755.
- (58) U. Haupts, J. Tittor, D. Oesterhelt *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, *28*, 367.
- (59) K. Edman, P. Nollert, A. Royant, H. Belrhali, E. Pebay-Peyroula, J. Hajdu, R. Neutze, E. M. Landau *Nature* **1999**, *401*, 822.
- (60) J. Tittor, M. Wahl, U. Schweiger, D. Oesterhelt *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1187*, 191.
- (61) I. Gill, A. Ballesteros *J. Am. Chem. Soc.* **1998**, *120*, 8587.
- (62) H. Frenkel-Mullerad, D. Avnir *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 8077.
- (63) I. Gill and A. Ballesteros *TIBTEC* **2000**, *18*, 469.
- (64) A. J. Patil, E. Muthusamy, S. Mann *Angew. Chem. Int. Ed.* **2004**, *43*, 4928.
- (65) D. D. Ion, M. Gonzalez, V. Slaez, J. Ramlon, J. Rieumont *IEE Proc. Nanobiotechnol.* **2005**, *152*, 165.
- (66) Z. Yang, A. J. Mesiano, S. Venkatasubramanian, S. H. Gross, J. M. Harris, A. J. Russell *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 4843.
- (67) R. T. Bartus, M. A. Tracy, D. F. Emerich, S. E. Zale *Science* **1998**, *281*, 1161.
- (68) W. Stoeckenius *Protein Science* **1999**, *8*, 447.
- (69) O. Hauser, E. Prieschl-Grassauer, B. Salmons *Curr. Opin. Mol. Therapeutics* **2004**, *6*, 412.
- (70) M. Löhr, J.-C. Kröger, A. Hoffmeyer, M. Freund, J. Hain, A. Holle, W. T. Knöfel, S. Liebe, H. Nizze, M. Renner, R. Saller, P. Müller, T. Wagner, K. Hauenstein, B. Salmons and W. H. Günzburg *Cancer Therapy* **2003**, *1*, 121.
- (71) K. Kailasapathy, S. H. Lam *Int. Dairy J.* **2005**, *15*, 929.
- (72) W. T. Leach, D. T. Simpson, T. N. Val, E. C. Anuta, Z. Yu, R. O. Williams, K. P. Johnston *J. Pharm. Sci.* **2005**, *94*, 56.
- (73) U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker *AAPS Pharm. Sci. Tech.* **2005**, *6*, 594.
- (74) G. Decher *Science* **1997**, *277*, 1232.

- (75) N. G. Balabushevitch, G. B. Sukhorukov, N. A. Moroz, D. V. Volodkin, N. I. Larionova, E. Donath, H. Möhwald *Biotechnol. Bioeng.* **2001**, 76, 207.
- (76) O. Kreft, R. Georgieva, H. Bäuml, M. Steup, B. Müller-Röber, G. B. Sukhorukov, H. Möhwald *Macromol. Rapid Commun.* **2006**, 27, 435.
- (77) F. E. Round, R. M. Crawford, D. G. Mann, *Diatoms, The Biology and Morphology of the Genera* (Cambridge University Press, Cambridge, **1990**).
- (78) E. G. Vrieling, T. P. M. Beelen, R. A. van Santen, W. W. C. Gieskes *J. Phycol.* **2000**, 36, 146.
- (79) N. Kröger, R. Deutzmann, M. Sumper *Science* **1999**, 286, 1129.
- (80) F. Noll, M. Sumper, N. Hampp *Nano Lett.* **2002**, 2, 91.
- (81) S. V. Patwardhan, S. J. Clarson *Silicon Chemistry* **2002**, 1, 207.
- (82) H. Menzel *et al.* *Chem. Commun.* **2003**, 24, 2994.
- (83) J. N. Cha, G. D. Stucky, D. E. Morse, T. J. Deming *Nature* **2000**, 403, 289.
- (84) K. Iler, *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties, and Biochemistry* (Wiley, New York, **1979**).
- (85) C. J. Brinker, G. W. Scherer, *Sol-gel Science: The Physics and Chemistry of Sol-gel Processing* (Academic Press, San Diego, **1990**).
- (86) J. Sefčič, A. V. McCormick *Catal. Today* **1997**, 35, 205.
- (87) S. Mitaku, K. Ikuta, H. Itoh, R. Kataoka, M. Naka, M. Yamada, M. Suwa *Biophys. Chem.* **1988**, 30, 69.
- (88) P. Wagner, M. Hegner, H.-J. Güntherodt, G. Semenza *Langmuir* **1995**, 11, 3867.
- (89) Diplomarbeit von Andreas Schönaufinger, *Darstellung und Charakterisierung nanostrukturierter, selbstassemblierender Monolagen auf ultraglaten Goldoberflächen* (Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg, **2004**).
- (90) C. Donzel *et al.* *Adv. Mater.* **2001**, 13, 1164.
- (91) J. Liu, A. G. Rinzler, H. Dai *et al.* *Science* **1998**, 280, 1253.
- (92) H. Yoshimura, T. Scheybani, W. Baumeister, K. Nagayama *Langmuir* **1994**, 10, 3290.

- (93) M. R. Oberholzer, N. J. Wagner, A. M. Lenhoff *J. Chem. Phys.* **1997**, *107*, 9157.
- (94) C. A. Johnson, Y. Yuan, A. M. Lenhoff *J. Coll. Interface Sci.* **2000**, *223*, 261.
- (95) H. Nygren, M. Stenberg *Biophys. Chem.* **1990**, *38*, 67.
- (96) B. Ren, G. Tibbelin, T. Kajino, O. Asami, R. Ladenstein *J. Mol. Biol.* **2003**, *329*, 467.
- (97) F. Caruso, D. N. Furlong, P. Kingshott *J. Coll. Interface Sci.* **1997**, *186*, 129.
- (98) R. G. Nuzzo, B. R. Zegarski, L. H. Dubois *J. Am. Chem. Soc.* **1987**, *109*, 733.
- (99) C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, R. G. Nuzzo *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 321.
- (100) A. Ulman, J. E. Eilers, N. Tillman *Langmuir* **1989**, *5*, 1147.
- (101) G. M. Whitesides, P. E. Laibinis *Langmuir* **1990**, *6*, 87.
- (102) A. Ulman *Chem. Rev.* **1996**, *96*, 1533.
- (103) K. Hu, A. J. Bard *Langmuir* **1997**, *13*, 5114.
- (104) C. T. Konek, M. J. Musorrafiti, H. A. Al-Abadleh, P. A. Bertin, S. T. Nguyen, F. Geiger *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 11754.
- (105) W. Norde, J. Lyklema *J. Coll. Interface Sci.* **1979**, *71*, 350.
- (106) K. L. Prime, G. M. Whitesides *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 10714.
- (107) C. Siegers, M. Biesalski, R. Haag *Chem. Eur. J.* **2004**, *10*, 2831.
- (108) A. Kumar, H. A. Biebuyck, G. M. Whitesides *Langmuir* **1994**, *10*, 1489.
- (109) H. Hedge, D. D. Dusen *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *135*, 1337.
- (110) H. Ohno, L. A. Nagahara, W. Mizutani, J. Takagiand, H. Tokumoto *Jpn. J. Appl. Phys.* **1999**, *38*, 180.
- (111) R. B. A. Sharpe *et. al. Langmuir* **2004**, *20*, 8646.
- (112) R. K. Workman, S. Manne *Langmuir* **2004**, *20*, 805.
- (113) T. Salditt, U. S. Schubert *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *90*, 55.
- (114) H. R. Luckarift, J. C. Spain, R. R. Naik, M. Stone *Nature Biotechnol.* **2004**, *22*, 211.

- (115)W. Stoeckenius, W. H. Kunau *J. Cell Biol.* **1968**, 38, 337.
- (116)D. J. Müller, A. Engel *Biophys. J.* **1997**, 73, 1633.
- (117)G. Krishna, T. Shutava, Y. Lvov *Chem. Commun.* **2005**, 22, 2796.
- (118)F. Caruso, R. A. Caruso, H. Möhwald *Science* **1998**, 282, 1111.
- (119)Doktorarbeit von Thorsten Fischer, *Photochemische und biochemische Modifikation von Bakteriorhodopsin: Optische Datenspeicherung und Hybridbio-Materialien* (Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg, **2005**).
- (120)S.Heinze, M. Bode, A. Kubetzka, O. Pietzsch, X. Nie, S. Blügel,W. Wiesendanger *Science* **2000**, 288, 1805.
- (121)J. R. Friedman, U. Voskoboynik, M. P. Sarachik *Phy. Rev. B* **1997**, 56, 10793.
- (122)G. Liu,S. Debnath, K, W, Paul, W. Han, D. B. Hausner, H.-A. Hosein, F. M. Michel, J. B. Parise, D. L. Sparks, D. R. Strongin *Langmuir* **2006**, 22, 9313.
- (123)Y. Cui, Q. Wie, H. Park, C. M. Lieber *Science* **2001**, 293, 1289.
- (124)Abbildung von: <http://www.alternative-cancer.net>
- (125)Abbildung von: www.gizmodo.de
- (126)Abbildung von: www-news.uchicago.edu
- (127)Abbildung von: www-ibmc.u-strasbg.fr
- (128)Doktorarbeit von Mariela Leticia Ponce, *Organic-Inorganic hybrid membranes with heteropolyacids for DMFC applications* (Fachbereich Chemie der Universität Hamburg, **2004**)

6. Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich mich bei denen bedanken, die am Gelingen dieser Arbeit beteiligt waren. Ich bitte um Verständniss, dass ich diese hier nicht alle namentlich nennen kann.

Großen Anteil am Gelingen dieser Arbeit hatte sicherlich mein Doktorvater, Herr Prof. Dr. Norbert Hampp, der durch wichtige Impulse den Gang der Arbeit unterstützt hat, mich dabei aber in meinem Forscherdrang niemals eingeschränkt sondern begleitet hat.

Bei dem Zweitgutachter, Herrn Prof. Dr. Lars-Oliver Essen, möchte ich mich zunächst dafür bedanken, dass er sich die Mühe macht, meine Arbeit zu bewerten. Ich hoffe, dass die Lektüre der Arbeit ihnen auch ein wenig Freude bereitet.

Des Weiteren danke ich ihnen, dass sie die fruchtbare Kooperation auf dem MrgA-Thema ermöglicht haben. In diesem Zusammenhang möchte ich mich auch bei Anke Morbitzer und Daniel Kress bedanken, ohne die viele Experimente nicht möglich gewesen wären.

Bei Dr. Andreas Schaper und vor allem bei Michael Hellwig möchte ich mich für die Unterstützung bei der Aufnahme von REM- und TEM-Bildern bedanken.

Ganz herzlich möchte ich mich bei den Mitarbeitern der Elektronik- und Mechanikwerkstatt für die schnelle und präzise Fertigung diverser Teile bedanken.

Allen Mitgliedern des Arbeitskreises Hampp danke ich, denn ohne deren Teamgeist, Fachkompetenz, Unterstützung in diversen Belangen und guten Humor hätte mir diese Arbeit sicherlich nicht so viel Freude bereitet und wäre in dieser Form nicht möglich

gewesen. Im Besonderen gilt dies für Dr. Frank Noll und meinen AFM- und Büro-Kollegen.